



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

EVALUASI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA (+)-2,2'-EPISITOSKIRIN A DAN MEKANISME KERJANYA

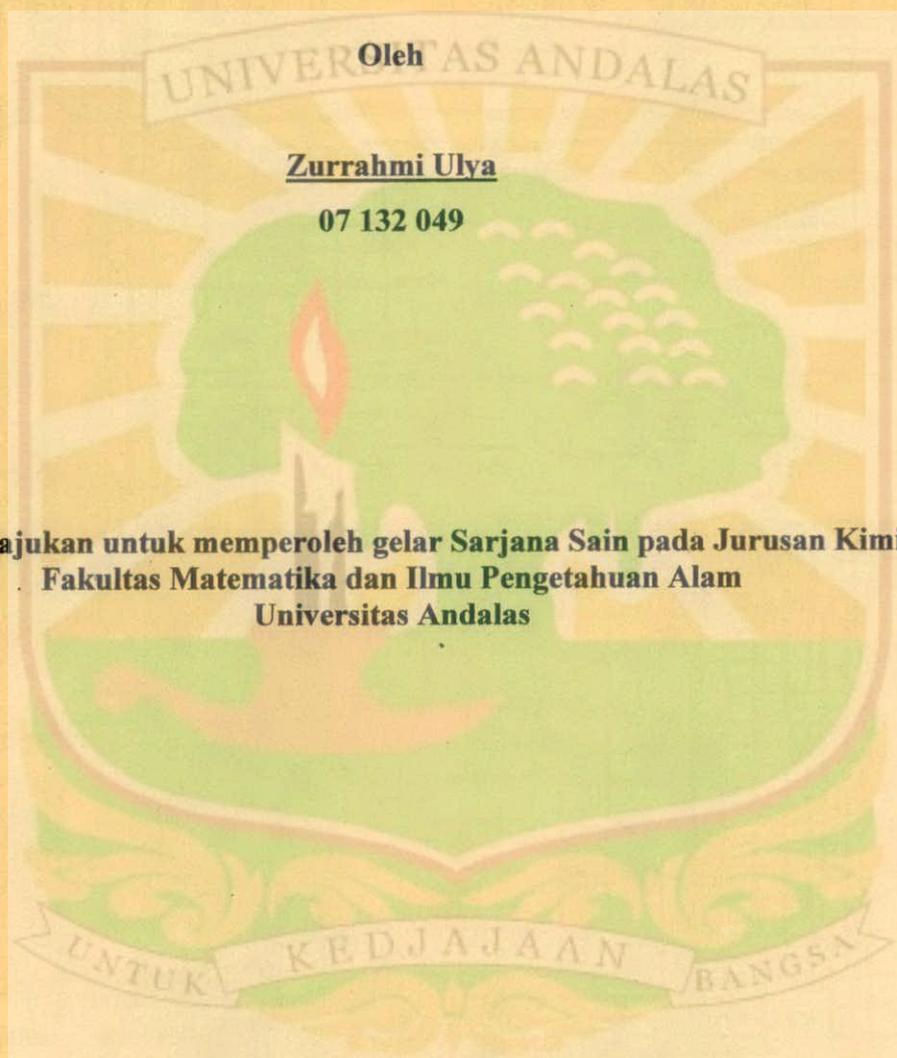
SKRIPSI



**ZURRAHMI ULVA
07 132 049**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

**EVALUASI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA
(+)-2,2'-EPISITOSKIRIN A DAN MEKANISME KERJANYA**

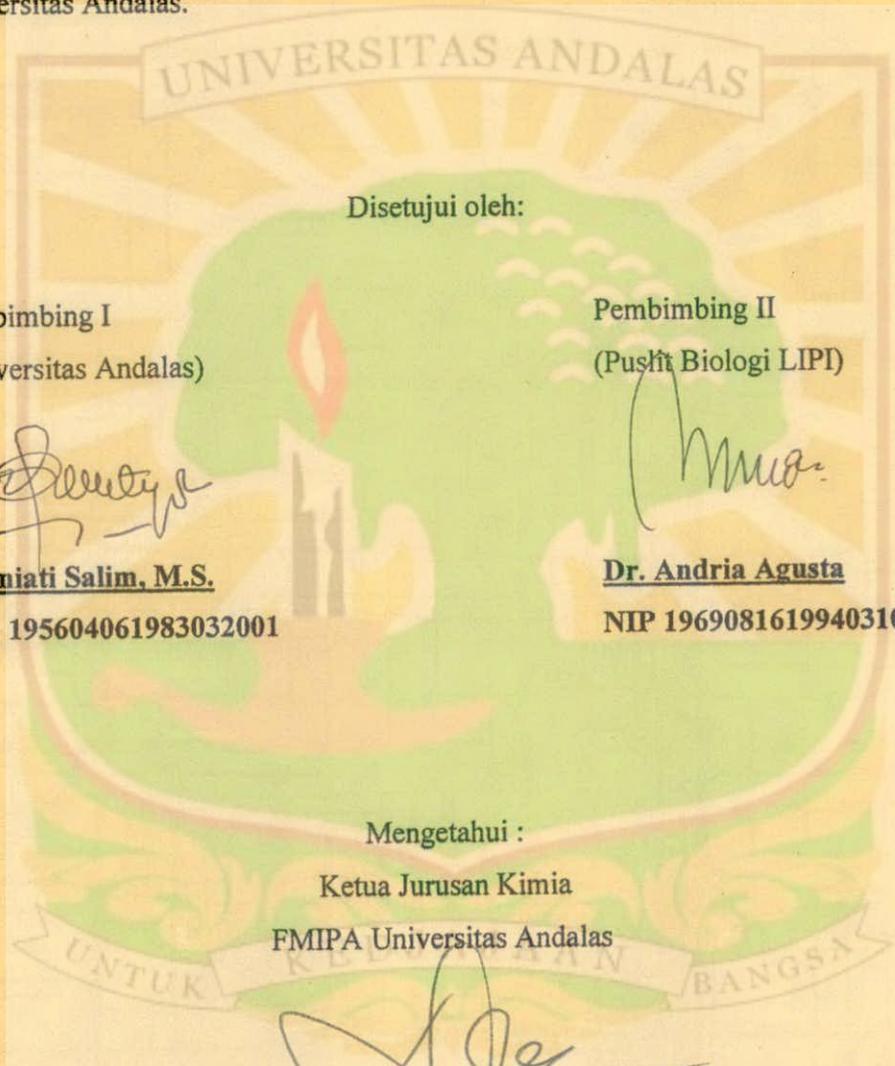


**Skripsi diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sain pada Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

HALAMAN PENGESAHAN

Evaluasi Aktivitas Antimikroba Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A dan Mekanisme Kerjanya merupakan skripsi oleh Zurrahmi Ulya (No. BP. 07 132 049) dan diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.



Disetujui oleh:

Pembimbing I
(Universitas Andalas)

Marniati Salim, M.S.

NIP. 195604061983032001

Pembimbing II
(Puslit Biologi LIPI)

Dr. Andria Agusta

NIP 196908161994031003

Mengetahui :

Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Andalas

Dr. Adlis Santoni

NIP. 196212031988111002

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah, puji syukur bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Evaluasi Aktivitas Antimikroba Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A dan Mekanisme Kerjanya**. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk mengikuti ujian sarjana di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih kepada Ibu Marniati Salim, MS selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Andria Agusta selaku pembimbing II sekaligus Kepala Laboratorium Biosain, Pusat Penelitian Biologi LIPI, di Cibinong, Bogor yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini. Rasa terima kasih yang mendalam juga saya sampaikan kepada Badan Penelitian Veteriner (Balitvet) dan Laboratorium Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI atas kemurahannya mengizinkan penulis menggunakan isolat mikroba pada penelitian ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya penulis sampaikan kepada Ayahanda Marwin Jamal, Ibunda Halimah Amir, dan kakak-kakak serta adik tercinta atas semua doa, kasih sayang serta dukungan yang tak terhingga, baik moril maupun materil.

Selanjutnya ucapan terima kasih juga disampaikan kepada :

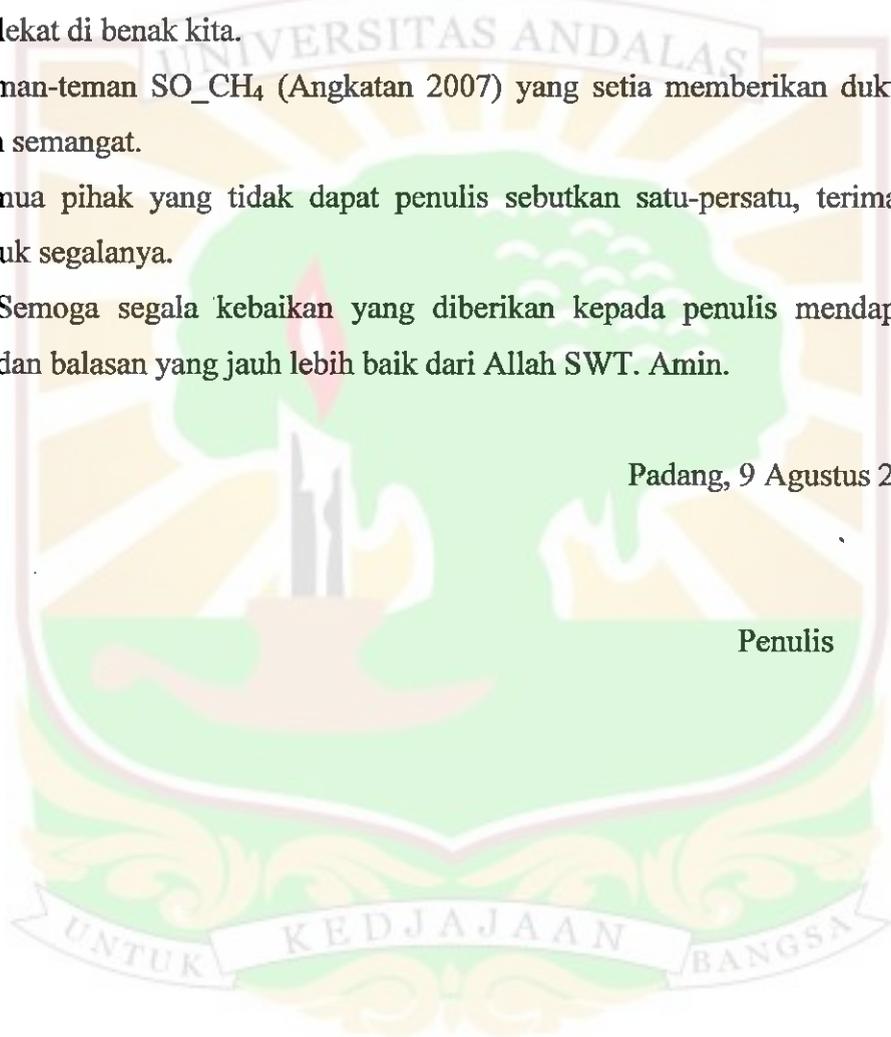
1. Bapak Prof. Dr. Emriadi selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas, Padang.
3. Bapak Prof. Dr. Hamzar Suyani sebagai pembimbing akademik yang selalu memberikan nasihat dan motivasi selama penulis menjalani perkuliahan di Jurusan Kimia FMIPA UNAND.

4. Staf pengajar dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu dan semangat.
5. Bu Yuli, Bu Hertina, Bu Tiwi, Mas Toni, dan Kang Asep yang selalu setia mendukung dan memberikan keceriaan selama penelitian di Laboratorium Biosain Puslit Biologi LIPI Cibinong. Teman-teman seperjuangan di LIPI (Miftah, Ayu, Dito, Shemy, dan Nila), terimakasih atas kebersamaan kita. Teman-teman baru (Isma, Anas, dan Tiara), semoga kenangan ini akan selalu melekat di benak kita.
6. Teman-teman SO₂CH₄ (Angkatan 2007) yang setia memberikan dukungan dan semangat.
7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih untuk segalanya.

Semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapatkan berkah dan balasan yang jauh lebih baik dari Allah SWT. Amin.

Padang, 9 Agustus 2011

Penulis



ABSTRAK

EVALUASI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA (+)-2,2'-EPISITOSKIRIN A DAN MEKANISME KERJANYA

Oleh
Zurrahmi Ulya

Sarjana Sain (S.Si) dalam bidang Kimia FMIPA Universitas Andalas
Dibimbing oleh Marniati Salim, MS dan Dr. Andria Agusta

Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A merupakan salah satu metabolit sekunder yang diisolasi dari jamur endofit *Diaporthe* sp. GNBP-10 (Gambir Nasi Batang Payakumbuh) yang berasosiasi dengan *Uncaria gambier* Roxb. Senyawa ini telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang relatif lebih kuat melawan beberapa mikroba patogen. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A terhadap mikroba patogen isolat klinis lainnya dan mengetahui mekanisme kerjanya. Aktivitas (+)-2,2'-episitoskirin A terlihat dari penentuan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Pengujian terhadap beberapa spesies *Candida* memperlihatkan kemampuan senyawa ini menghambat pertumbuhan *C. tropicalis* LIPIMC 60 dengan nilai MIC 16 µg/mL. Senyawa ini juga memperlihatkan aktivitas terbaik terhadap *S. aureus* B1452 dengan nilai MIC 0,06 µg/mL. Selanjutnya, mekanisme kerja (+)-2,2'-episitoskirin A ditentukan dengan pengukuran kadar asam nukleat dan protein (UV-Vis), ion Ca^{2+} dan K^+ (AAS), serta pengamatan morfologi sel (SEM) dari kedua mikroba tersebut. Hasil yang didapatkan memperlihatkan mekanisme kerja (+)-2,2'-episitoskirin A tidak melalui perusakan membran sel. Kematian sel mikroba terjadi melalui proses apoptosis.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF (+)-2,2'-EPICYTOSKYRIN A AND ITS MECHANISM OF ACTION

By
Zurrahmi Ulya

Bachelor of Science in Chemistry Department, Faculty of Mathematic and
Natural Science, Andalas University
Advised by Marniati Salim, MS and Dr. Andria Agusta

(+)-2,2'-Epicytoskyrin A is a main of secondary metabolites found in culture of the endophytic fungi *Diaporthe* sp GNBP-10 (Gambir Nasi Batang Payakumbuh) associated with *Uncaria gambier* Roxb. This compound has strong antimicrobial activities against some pathogenic microbes. The aim of this study is to evaluate the antimicrobial activities of (+)-2,2'-epicytoskyrin against the other clinical isolate of microbes and determine its mechanism of action. The antimicrobial potency of (+)-2,2'-epicytoskyrin is determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value. The result showed (+)-2,2'-epicytoskyrin could inhibit *C. tropicalis* LIPIMC 60 with MIC value 16 µg/mL. On the other hand, the compound has strong activity against *S. aureus* B1452 with MIC value 0,06 µg/mL. Furthermore the mechanism of action of (+)-2,2'-epicytoskyrin is determined by measurement of nucleic acid and protein (UV-Vis), Ca²⁺ and K⁺ ions leakage (AAS) and observation of cell morphology (SEM) of both *C. tropicalis* LIPIMC 60 and *S. aureus* B1452. The result showed the mechanism of action of (+)-2,2'-epicitoskirin is not damaged the cell membrane. The cell death by apoptosis.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tumbuhan Gambir	4
2.2 Jamur Endofit	5
2.2.1 Jamur <i>Diaporthe</i> sp.	6
2.3 Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A	7
2.4 Antimikroba	7
2.4.1 Aktivitas Antimikroba	8
2.4.2 Mekanisme Antimikroba	8
2.5 Proses Kematian Sel	13
2.6 Mikroba Uji	15
2.6.1 Jamur Uji	15
2.6.2 Bakteri Uji	16
III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan	19
3.2.1 Alat	19

3.2.2 Bahan	19
3.3 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Penentuan Nilai MIC	22
3.3.2 Analisis Kebocoran Protein dan Asam Nukleat	23
3.3.3 Analisis Kebocoran Ion-ion Logam	24
3.3.4 Analisis Perubahan Morfologi Sel	24
IV. HASIL DAN DISKUSI	
4.1 Penentuan Nilai MIC	25
4.2 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A	27
4.2.1 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa(+)-2,2'-Episitoskirin A Terhadap <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	28
4.2.2 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa(+)-2,2'-Episitoskirin A Terhadap <i>S. aureus</i> B1452	32
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Nilai MIC Larutan Uji Dibandingkan Antibiotik Komersial
Menghambat Pertumbuhan Mikroba Patogen

25



DAFTAR GAMBAR

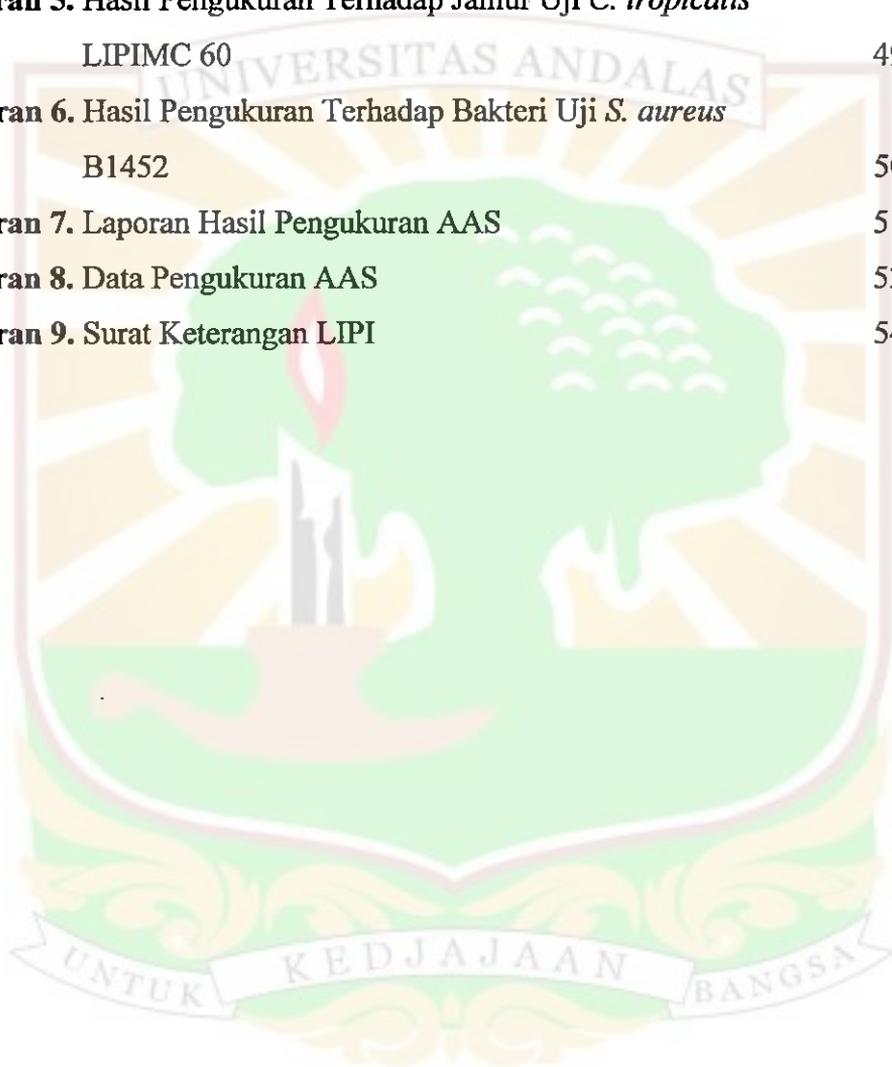
Gambar 1. Tumbuhan Gambir (<i>Uncaria gambier roxb</i>)	4
Gambar 2. Pembentukan <i>perithecia</i> dari <i>Diaporthe</i> sp. GNPB-10	6
Gambar 3. Jamur Endofit <i>Diaporthe</i> sp. GNPB-10 pada Medium PDA Selama 1 Bulan	6
Gambar 4. Struktur Molekul Kimia (+)-2,2'-Episitoskirin A	7
Gambar 5. Penghambatan Metabolisme Sel Antimikroba oleh Antibiotik	9
Gambar 6. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram positif dan Bakteri Gram negatif	10
Gambar 7. Mekanisme Bahan Antimikroba Terhadap Bakteri Gram negatif dan Gram positif	11
Gambar 8. Mekanisme Gangguan pada Membran Sel Gram positif oleh Antibiotik Daptomisin (Lipopeptida)	11
Gambar 9. Penghambatan Sintesis Protein oleh Berbagai Antibiotik	12
Gambar 10. Mekanisme Kerja Kuinolon (Salah Satu Antibiotik yang Menghambat Sintesis Asam Nukleat)	13
Gambar 11. Apoptosis dan Nekrosis	14
Gambar 12. Perbedaan Morfologi Apoptosis dan Nekrosis	15
Gambar 13. <i>Candida</i> sp.	16
Gambar 14. Morfologi Bakteri (a) <i>B. subtilis</i> (b) <i>S. aureus</i> (c) <i>S. typhimurium</i> (d) <i>E. coli</i>	16
Gambar 15. Hasil Pengukuran Absorban Asam Nukleat (260 nm) dan Protein (280 nm) pada Jamur Uji <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	28
Gambar 16. Hasil Pengukuran Konsentrasi Ion-ion Logam (Ca^{2+} dan K^{+}) dari Jamur Uji <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	29
Gambar 17. Perubahan Morfologi Sel Jamur Uji <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	31
Gambar 18. Sel yang Mengalami Apoptosis	32
Gambar 19. Hasil Pengukuran Absorban Asam Nukleat (260 nm) dan Protein (280 nm) pada Bakteri Uji <i>S. aureus</i> B1452	33

Gambar 20. Hasil Pengukuran Konsentrasi Ion-ion Logam (Ca^{2+} dan K^+) dari Bakteri Uji <i>S. aureus</i> B1452	34
Gambar 21. Perubahan Morfologi Sel Bakteri Uji <i>S. aureus</i> B1452	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja	41
Lampiran 2. Alat-alat yang Digunakan	44
Lampiran 3. Hasil Penentuan MIC <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	45
Lampiran 4. Hasil Penentuan MIC <i>S. aureus</i> B1452	47
Lampiran 5. Hasil Pengukuran Terhadap Jamur Uji <i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	49
Lampiran 6. Hasil Pengukuran Terhadap Bakteri Uji <i>S. aureus</i> B1452	50
Lampiran 7. Laporan Hasil Pengukuran AAS	51
Lampiran 8. Data Pengukuran AAS	53
Lampiran 9. Surat Keterangan LIPI	54



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroba patogen merupakan salah satu penyebab penyakit yang banyak diderita oleh masyarakat, baik berupa bakteri maupun jamur. Golongan mikroba tersebut dapat menyebabkan penyakit yang cukup berbahaya misalnya typhus, pneumonia dan diare. Untuk mengatasi penyakit-penyakit tersebut diperlukan senyawa antibiotik yang efektif untuk membunuh mikroba penyebab penyakit tersebut.¹

Banyak penelitian telah dilakukan untuk menemukan antibiotik baru dari berbagai sumber, seperti tumbuhan, hewan, organisme laut, dan mikroba. Di antara sumber-sumber tersebut, mikroba merupakan sumber yang paling banyak digunakan karena mudah dalam penanganannya. Golongan mikroba ini meliputi jamur/fungi, bakteri dan aktinomisetes. Salah satu sumber senyawa bioaktif yang berasal dari mikroba adalah mikroba endofit.²

Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat. Mikroba endofit memiliki potensi yang besar dalam pencarian sumber-sumber obat baru. Selain mudah ditumbuhkan, mikroba juga memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan jumlah senyawa bioaktif dalam jumlah besar dengan metode fermentasi.³

Mikroba endofit merupakan mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tumbuhan pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Mikroba endofit paling umum ditemukan dari jenis fungi.^{2,4}

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa jamur endofit memiliki karakteristik sebagai sumber berbagai jenis metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang bervariasi. Selain sebagai antibiotik, jamur endofit juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai agen antikanker, antivirus, antioksidan dan insektisidal. Berbagai golongan senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, anthraquinon, kuinon, fenil propanoid, turunan isokumarin, senyawa alifatik, peptida, dan senyawa lainnya telah diisolasi dan dikarakteristik dari kultur jamur endofit.^{2,3,5}

Jamur *Diaporthe* sp. merupakan salah satu jenis jamur endofit yang telah diisolasi dari tanaman gambir varietas nasi. Penelitian ini kemudian dilanjutkan dengan mengisolasi metabolit sekunder yang berada pada jamur endofit tersebut dan menghasilkan metabolit sekunder, yaitu (+)-2,2'-episitoskirin A.^{6,7}

Metabolit sekunder ini sudah terbukti memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa jenis mikroba patogen. Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A dilaporkan memiliki aktivitas antifungi terhadap *Aspergillus flavus* dengan nilai konsentrasi hambat minimum 64 µg/mL. Senyawa ini juga menyebabkan perubahan pada hifa jamur *Fusarium oxysporum* dengan konsentrasi hambat minimum 100 µg/mL. Selain itu, pada konsentrasi 1 MIC (64 µg/mL) senyawa ini dapat menyebabkan kebocoran pada membran sel bakteri. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya kebocoran asam nukleat, protein, dan ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+), serta menyebabkan perubahan morfologi sel bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.^{7,8,9}

Sejauh ini, senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A dilaporkan memiliki sifat sebagai antimikroba terhadap bakteri dan jamur patogen tertentu. Penting bagi kita untuk mengetahui pengaruh senyawa ini terhadap mikroba patogen lainnya mengingat banyaknya mikroba patogen sumber penyakit dalam kehidupan kita. Untuk itu, pada penelitian ini dilakukan evaluasi aktivitas antimikroba senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A terhadap jenis bakteri dan jamur patogen yang merupakan isolat klinik lainnya serta mengetahui mekanisme kerjanya.

1.2 Perumusan Masalah

Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang baik terhadap beberapa jenis mikroba patogen. Dari hal ini, diangkat suatu masalah untuk menentukan bagaimana aktivitas senyawa ini terhadap mikroba uji yang merupakan isolat klinik lainnya serta bagaimana pula mekanisme kerjanya dalam menghambat pertumbuhan mikroba uji yang merupakan isolat klinik tersebut.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui aktivitas biologi senyawa (+)-2,2'-episitokirin A sebagai antimikroba melawan bakteri dan jamur patogen isolat klinik melalui penentuan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)
2. Menentukan mekanisme aktivitas antimikroba melalui data kebocoran protein, asam nukleat, ion K^+ dan Ca^{2+} serta menentukan pengaruh senyawa (+)-2,2'-episitokirin A terhadap kerusakan morfologi sel mikroba uji menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM).

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan ilmiah bagi para peneliti dalam penggunaan metabolit sekunder untuk pengobatan sehingga teruji secara ilmiah serta digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk diaplikasikan dalam pengembangan obat antibiotik yang berasal dari jamur endofit.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Gambir

Tumbuhan gambir termasuk tumbuhan perdu yang memiliki batang keras yang membelit. Daunnya bertangkai pendek dan berwarna hijau muda. Bunganya berwarna putih, berbentuk kecil dan tongkol bulat. Bagian gambir yang dipanen adalah daun dan ranting. Gambir telah lama digunakan sebagai salah satu ramuan makan sirih. Selain itu gambir digunakan sebagai antiseptik, obat sakit perut, bahan pencampur kosmetika, zat pewarna, dan bahan penyamak kulit. Adapun kandungan tumbuhan gambir antara lain, asam katechu tannat (tannin), katekin, pyrocatecol, florisin, lilin, *fixed oil*. Tumbuhan gambir adalah komoditas spesifik Sumatera Barat. Salah satu sentra produksi gambir di Sumatera Barat adalah Kabupaten Limapuluh Kota, Payakumbuh.¹⁰

Taksonomi tumbuhan gambir adalah sebagai berikut :

- Kerajaan : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Gentianales
- Famili : Rubiaceae
- Genus : *Uncaria*
- Spesies : *U. gambier* (W. Hunter) Roxb.(1824)

Tumbuhan gambir dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier* roxb).¹¹

2.2 Jamur Endofit

Endofit berasal dari bahasa Yunani, “endo” berarti di dalam dan “fit” (*phyte*) berarti tumbuhan. Istilah endofit mencakup semua organisme yang dapat membentuk koloni pada jaringan internal tanaman inangnya tanpa menimbulkan penyakit pada periode tertentu. Endofit dapat ditemukan pada berbagai jaringan tanaman seperti buah, batang, akar, dan daun.^{5, 12}

Mikroba endofit yang paling umum ditemukan adalah dari jenis jamur. Asosiasi jamur endofit dengan tumbuhan inangnya digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan induktif. Mutualisme konstitutif merupakan asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini jamur endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetatif inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama.^{2, 13}

Jamur endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang mirip dengan tanaman inangnya. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit lebih banyak jika dibandingkan dengan kelas mikroorganisme endofit lainnya. Bahan alam yang dihasilkan dari jamur endofit memiliki aktivitas biologi dengan spektrum yang luas. Beberapa golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit antara lain, alkaloid, steroid, terpenoid, isokumarin, kuinon, fenol, lakton, metabolit alifatik, dan lain-lain.¹²

Beberapa penelitian telah membuktikan aktivitas biologi yang bervariasi dari metabolit yang diproduksi oleh mikroba endofit :

1. Mikroba endofit yang memproduksi antibiotika

Pseudomisin yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Pseudomonas syringae* berkhasiat sebagai antijamur yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Cryptococcus neoformans*.¹⁴

2. Mikroba endofit yang memproduksi antivirus

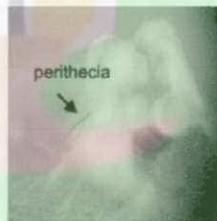
Jamur endofit *Cytospora* sp. dapat menghasilkan metabolit asam sitonat A dan B, yang mana struktur molekulnya merupakan isomer *p*-tridepsida,

berkhasiat sebagai antivirus. Asam sitonat A dan B ini merupakan protease inhibitor dan dapat menghambat pertumbuhan cytomegalovirus manusia.²

3. Mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sebagai antikanker
Paclitaxel dan derivatnya merupakan zat yang berkhasiat sebagai antikanker yang pertama kali ditemukan dan diproduksi oleh mikroba endofit. Paclitaxel merupakan senyawa diterpenoid yang didapatkan dalam tanaman *Taxus*. Senyawa yang dapat mempengaruhi molekul tubulin dalam proses pembelahan sel-sel kanker ini, umumnya diproduksi oleh endofit *Pestalotiopsis microspora* yang diisolasi dari tanaman *T. wallichiana* dan endofit *Taxus andreanae* dari tanaman *T. brevifolia*.²

2.2.1 Jamur *Diaporthe* sp.

Jamur *Diaporthe* sp. merupakan salah satu jenis jamur endofit yang dapat diisolasi dari tanaman teh (*Camelia sinensis*) dan tanaman gambir (*Uncaria gambier* Roxb). Salah satu parameter utama identifikasi jamur *Diaporthe* sp. adalah pembentukan *perithecia*. Pembentukan *perithecia* terlihat pada hari ke-45 kultivasi yang ditandai dengan bentuk tiang kecil berwarna hitam (Gambar 2).^{5,6,15}



Gambar 2. Pembentukan *perithecia* dari *Diaporthe* sp. GNPB-10. ⁶

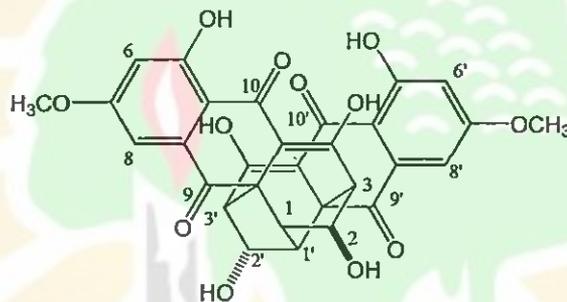
Jamur *Diaporthe* sp. GNPB-10 diisolasi dari bagian batang tanaman gambir yang dikultivasi pada media PDA selama 1 bulan (Gambar 3). Metabolit utama yang terkandung dalam jamur ini adalah (+)-2,2'-episitoskirin A dan (+)-1,1'-bislunatin.¹⁶



Gambar 3. Jamur Endofit *Diaporthe* sp. GNPB 10 pada Medium PDA Selama 1 Bulan. ¹⁶

2.3 Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A

Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A merupakan salah satu senyawa golongan bisantrakuinon hasil isolasi dari jamur endofit jenis *Diaporthe* sp. Pada medium PDA, jamur endofit *Diaporthe* sp. menghasilkan 17,5 mg/L (+)-2,2'-episitoskirin A dalam jangka waktu satu bulan pada suhu ruang. Sementara pada medium PDB, jamur endofit ini menghasilkan 47,0 mg/L (+)-2,2'-episitoskirin A dalam jangka waktu dua minggu pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi (*rotary shaker*) 90 rpm. Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A (Gambar 4) merupakan 2,2'-dihidroksi epimer sitoskirin A dengan rumus molekul $C_{30}H_{23}O_{12}$ pada metoda FAB-MS serta berwarna kuning. Senyawa ini memiliki putaran optis $[\alpha]_D +447^\circ$ ($c=0,53$, dalam EtOH pada $26^\circ C$).¹⁵



Gambar 4. Struktur Molekul Kimia (+)-2,2'-Episitoskirin A.¹⁵

Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki potensi sebagai antibiotik dengan daya antimikroba yang kuat. Senyawa ini mampu menyaingi antibiotika komersial dengan nilai MIC yang lebih baik diuji terhadap *E. coli*, *M. luteus*, dan *R. minuta*. Senyawa ini memiliki mekanisme antifungal secara apoptosis pada konsentrasi 10 $\mu g/mL$. Secara *in vitro*, senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki efek sitotoksik terhadap sel-sel KB (kanker mulut) dengan nilai inhibiton concentration IC_{50} 0,5 $\mu g/mL$. Selain itu, senyawa ini juga dapat dinyatakan sebagai agen interkalasi DNA karena memiliki interaksi dengan DNA.^{7, 15, 16}

2.4 Antimikroba

Antimikroba didefinisikan sebagai obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Dalam hal ini, yang dimaksudkan dengan mikroba terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit. Menurut Pelczar

dan Reid (1979), yang dimaksud dengan antimikroba adalah senyawa kimia yang mempunyai efek dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas dari mikroba. ^{17,18}

Sedangkan antibiotik ialah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain. Strobel (2003) menjelaskan bahwa antibiotik merupakan produk organik alam dengan berat molekul rendah yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang aktif pada konsentrasi rendah terhadap mikroorganisme lainnya. Banyak antibiotik dewasa ini dibuat secara semisintetik maupun sintetik penuh. ^{4,17}

2.4.1 Aktivitas Antimikroba

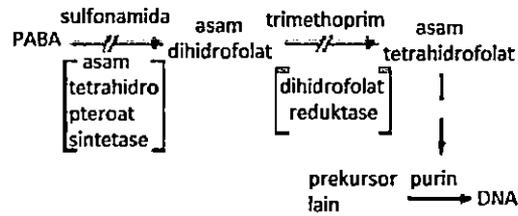
Berdasarkan sifat toksisitas selektif, aktivitas antimikroba terbagi menjadi dua, yaitu mikrostatik bersifat menghambat pertumbuhan mikroba; dan mikrosidal bersifat membunuh mikroba. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*) dan kadar bunuh minimum (*Minimum bactericidal Concentration/MBC*). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari mikrostatik menjadi mikrosidal bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi MIC. ¹⁷

2.4.2 Mekanisme Kerja Antibiotika

Kemampuan suatu senyawa antimikroba dalam menghambat atau membunuh mikroba dipengaruhi oleh mekanisme kerja antimikroba tersebut. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok :

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba akan bersaing dengan PABA untuk ikut serta dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional (Gambar 5). Akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu.

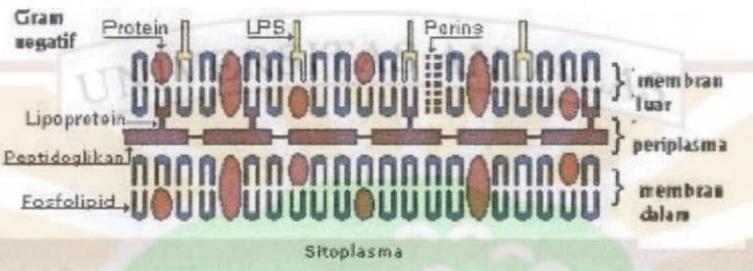
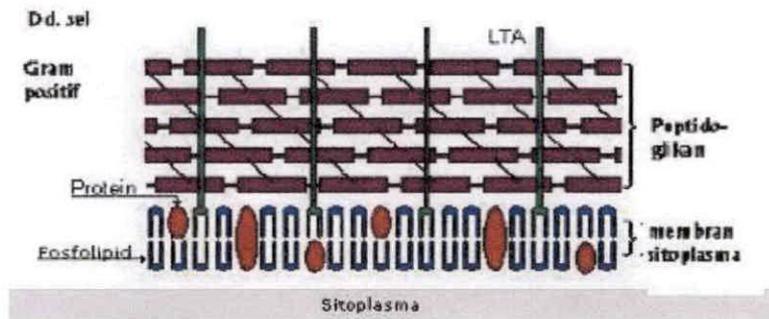


Gambar 5. Penghambatan Metabolisme Sel Mikroba oleh Antibiotik

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

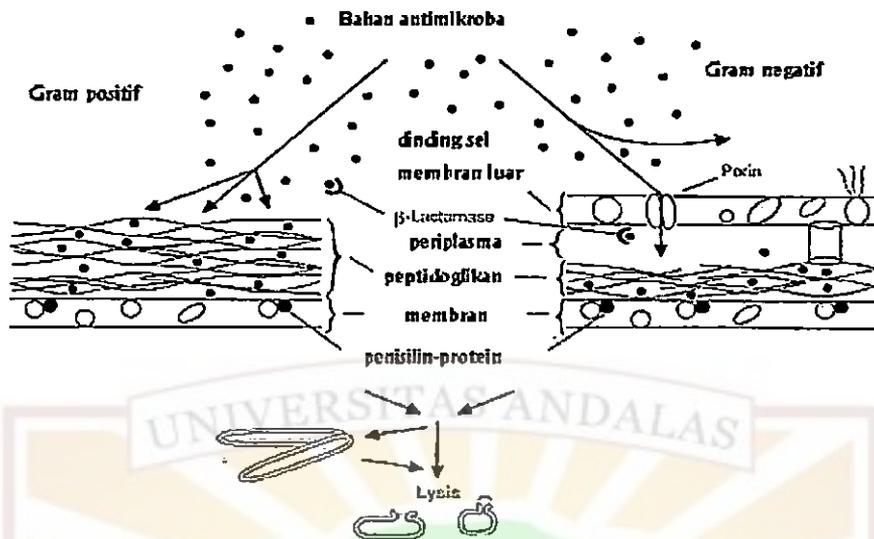
Dinding sel bakteri, terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Keseluruhan rangkaian penghambatan sintesis dinding sel akan menyebabkan tekanan osmotik dalam sel mikroba lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel mikroba akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek mikrosidal pada mikroba yang peka.

Unit dasar dari dinding sel bakteri disusun oleh peptidoglikan (murein, mukopeptida) yang berfungsi secara mekanis untuk melindungi dan memberikan ketegaran pada dinding sel. Bakteri Gram positif mempunyai lapisan peptidoglikan yang berselang seling dengan asam teikoat atau polimer asam yang lainnya. Pada bakteri Gram negatif, lapisan peptidoglikan yang tipis berdekatan dengan membran sitoplasma, sedangkan pada bagian luarnya terdapat lapisan luar yang mengandung lipoprotein, lipopolisakarida, protein dan fosfolipid seperti terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur Dinding Sel Bakteri Gram positif dan Bakteri Gram negatif

Perbedaan struktur dinding sel berpengaruh pada ketahanannya terhadap perlakuan bahan antimikroba dan bagian penting dari dinding adalah lapisan peptidoglikan (Gambar 7) karena lapisan ini berfungsi untuk melindungi sel bakteri dari perubahan kondisi lingkungan dan faktor-faktor luar yang menyebabkan kerusakan membran sel yang berakibat kematian sel bakteri tersebut. Bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap perlakuan biosida dari pada bakteri Gram negatif. Mekanisme masuknya bahan antimikroba terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif berbeda seperti terlihat pada Gambar 7. Dari Gambar 7 terlihat bahwa pada bakteri Gram positif, bahan antimikroba dapat langsung masuk dan akan mengisi lapisan peptidoglikan kemudian berikatan dengan protein, selanjutnya dapat menyebabkan bakteri tersebut lisis. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, bahan tersebut masuk melalui porin yang terdapat pada lapisan luar, kemudian masuk ke lapisan peptidoglikan dan selanjutnya membentuk ikatan dengan protein.

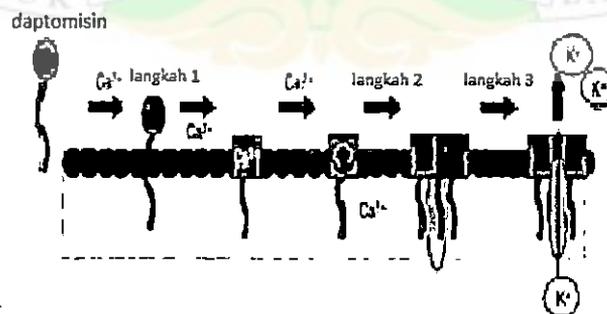


Gambar 7. Mekanisme Bahan Antimikroba Terhadap Bakteri Gram negatif dan Gram positif

3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Membran sel atau membran sitoplasma berfungsi sebagai pelindung atau penahan dan tersusun atas fosfolipid (70 %) yang merupakan struktur dasar dari membran dan protein (30 %). Adanya kerusakan membran sel maka akan memudahkan asam-asam organik berpenetrasi ke membran sitoplasma dan akan mengakibatkan sel mengalami kebocoran.

Polimiksin sebagai senyawa amonium-kuartener dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Polimiksin tidak efektif terhadap kuman Gram-positif karena jumlah fosfor bakteri ini rendah. Kuman Gram-negatif yang menjadi resisten terhadap polimiksin, ternyata jumlah fosfornya menurun. Salah satu contoh gangguan pada membran sel bakteri Gram positif dapat dilihat pada Gambar 8.

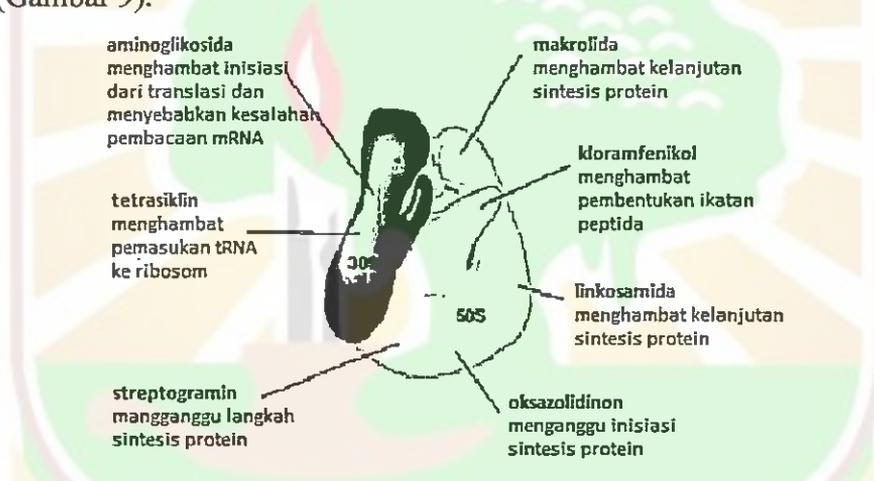


Gambar 8. Mekanisme Gangguan pada Membran Sel Gram positif oleh Antibiotik Daptomisin (Lipopeptida)

Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel jamur sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Bakteri tidak sensitif terhadap antibiotik polien, karena tidak memiliki struktur sterol pada membran selnya.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Untuk kehidupannya sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara (Gambar 9).



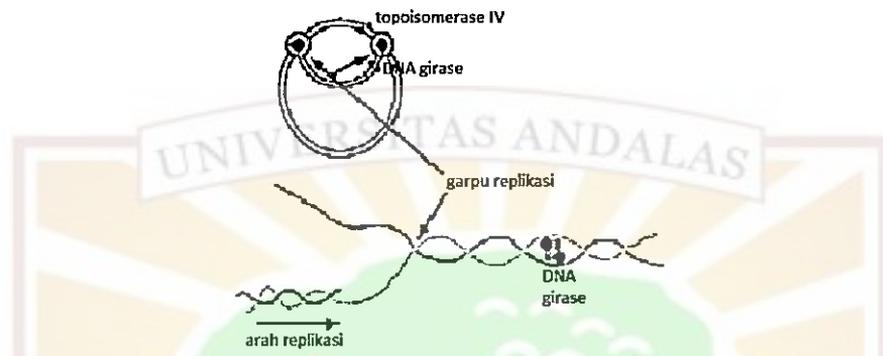
Gambar 9. Penghambatan Sintesis Protein oleh Berbagai Antibiotik

Eritromisin berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Sedangkan kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase.

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Antimikroba tertentu memiliki mekanisme kerja dengan cara berikatan pada enzim polimerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Ada pula antimikroba yang dapat menghambat

enzim DNA girase pada kuman. Adapun fungsi DNA girase adalah menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel kuman yang kecil. Hambatan pada aktivitas DNA girase akan menyebabkan kematian sel mikroba. Penghambatan sintesis asam nukleat oleh antibiotik kuinolon dapat dilihat pada Gambar 10.¹⁷



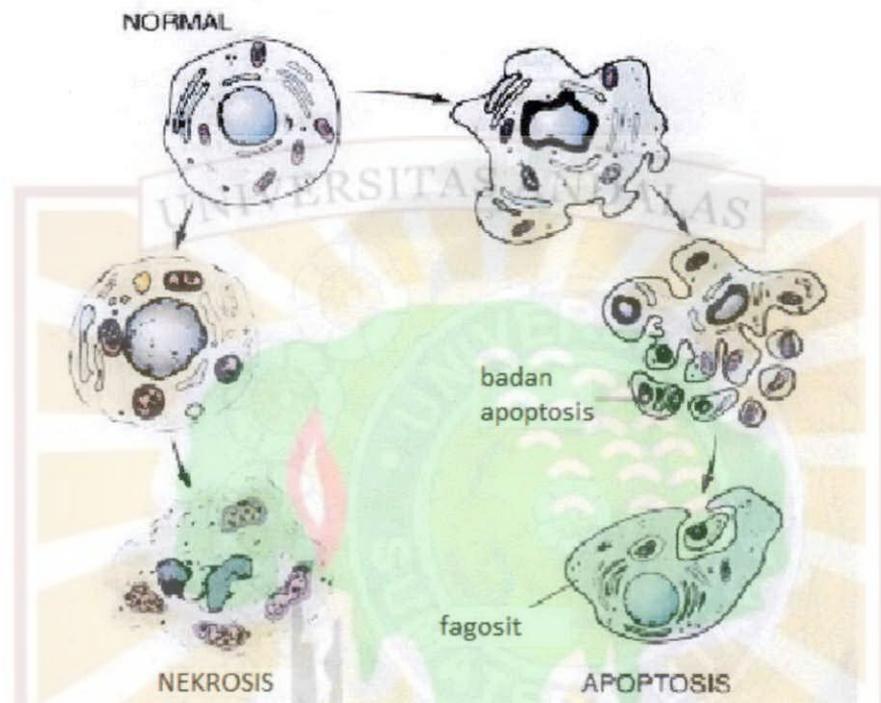
Gambar 10. Mekanisme Kerja Quinolon (Salah Satu Antibiotik yang Menghambat Sintesis Asam Nukleat)

2.5 Proses Kematian Sel

Setiap organisme yang hidup terdiri dari ratusan tipe sel, yang semuanya berasal dari fertilisasi sel telur. Selama perkembangannya sejumlah sel bertambah secara dramatis yang kemudian akan membentuk berbagai jenis jaringan dan organ. Seiring dengan pembentukan sel yang baru tersebut, sel yang mati merupakan proses regulasi yang normal pada sejumlah sel dari jaringan.^{19,20}

Apoptosis dan nekrosis merupakan proses dari kematian sel. Apoptosis merupakan proses kematian sel secara terprogram yang dikendalikan dengan kontrol genetik yang kuat. Apoptosis dapat dikenali dari perubahan biokimia dan morfologi yang terjadi pada sel. Secara biokimia, terjadi aktivasi berbagai endonuklease dan protease sehingga DNA dipecah-pecah menjadi fragmen-fragmen dengan panjang berbeda. Secara morfologi, kematian sel secara apoptosis dapat dikenali dengan adanya perubahan bentuk sel, yaitu penyusutan sel, lepasnya kontak dengan sel tetangga, kromatin sel memadat, membran plasma berubah bentuk, dan akhirnya sel difragmentasikan menjadi membran yang tersusun padat, yang disebut dengan ‘badan apoptosis’ yang mengandung sitosol, kromatin padat, dan organ-organ lainnya. Proses ini berakhir dengan dimakannya sel-sel tersebut (badan apoptosis) oleh sel-sel yang berada di sekitarnya, misalnya

makrofag tanpa merespon rangsangan inflamasi atau peradangan. Pada nekrosis terjadi kematian sel tidak terkontrol. Sel yang mati pada nekrosis akan membesar dan kemudian hancur dan lisis pada satu daerah yang merupakan respon inflamasi. Proses apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada Gambar 11. ^{16,20}

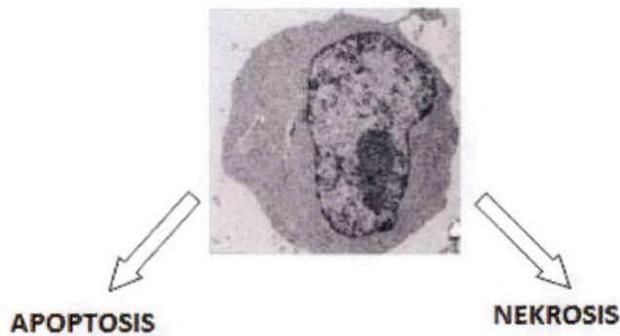


Gambar 11. Apoptosis dan Nekrosis

Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

Proses apoptosis berbeda dengan nekrosis. Nekrosis merupakan kematian sel yang terjadi pada organisme hidup yang dapat disebabkan oleh *injury* maupun infeksi. Pada nekrosis terjadi perubahan pada inti yang pada akhirnya dapat menyebabkan inti menjadi lisis dan membran plasma menjadi pecah. ²⁰

Pada apoptosis terjadi kematian sel yang terprogram dan membran inti tidak pecah, dan mengalami fragmentasi yang kemudian mengirimkan sinyal kepada sel yang berada didekatnya untuk difagosit. Perbedaan apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada Gambar 12. ²⁰



Gambaran	Apoptosis	Nekrosis
Penyebab	Fisiologi dan Patologi	Patologi
Keterlibatan	Satu sel	Sekelompok sel
Proses biokimia	Energi oleh DNA	Homeostasis
Keutuhan sel membran	Diperbaiki	Lisis
Morfologi	Sel mengkerut dan pecah	Hilang
Proses peradangan	Tidak ada	Sering
Proses kematian sel	Diserap atau pagositosis sel tetangganya	Diserap oleh netropil PMN dan makropag

Gambar 12. Perbedaan Morfologi Proses Apoptosis dan Nekrosis

2.6 Mikroba Uji

2.6.1 Jamur Uji

Pada penelitian ini digunakan jamur uji yang merupakan spesies *Candida*. *Candida* adalah anggota flora normal terutama saluran pencernaan, juga selaput mukosa saluran pernafasan, vagina, uretra, kulit dan dibawah jari-jari kuku tangan dan kaki. Di tempat-tempat ini ragi dapat menjadi dominan dan menyebabkan keadaan-keadaan patologik ketika daya tahan tubuh menurun baik secara lokal maupun sitemik. *Candida* dapat menimbulkan invasi dalam aliran darah, tromboflebitis, endokarditis, atau infeksi pada mata dan organ-organ lain bila dimasukkan secara intravena.²¹

Candida tampak sebagai ragi lonjong, kecil, berdinding tipis, bertunas, berukuran 2-3 x 4-6 μm , yang memanjang menyerupai hifa (pseudohifa). *Candida* membentuk pseudohifa ketika tunas-tunas terus tumbuh tetapi gagal melepaskan diri, menghasilkan rantai sel-sel yang memanjang yang terjepit atau tertarik pada septasi-septasi diantara sel. Pada agar saboroud yang dieramkan pada suhu kamar atau 37 °C selama 24 jam, spesies *Candida* menghasilkan koloni-koloni halus

berwarna krem yang mempunyai bau seperti ragi. Pertumbuhan permukaan terdiri atas sel-sel bertunas lonjong. Pertumbuhan di bawahnya terdiri atas pseudomiselium. Ini terdiri atas pseudohifa yang membentuk blastokonidia pada nodus-nodus dan kadang-kadang klamidokonidia pada ujung-ujungnya.²²

Spesies *Candida* merupakan penyebab umum infeksi oleh jamur. Penyakit jamur yang disebabkan oleh *Candida* disebut Kandidiasis, dapat bersifat akut atau subakut dan dapat mengenai mulut, vagina, kulit, kuku, bronki atau paru, kadang-kadang dapat menyebabkan septikemia, endokarditis, atau meningitis.²³

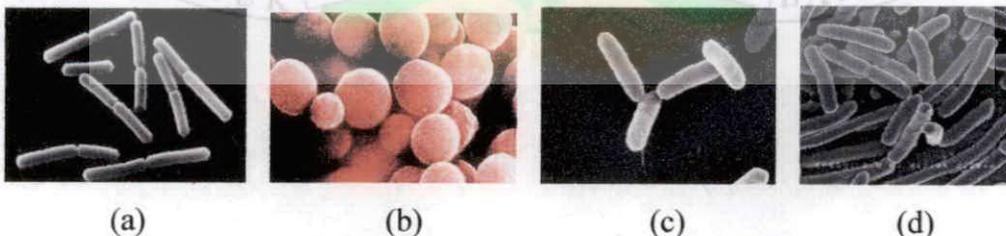
Candida tropicalis, *Candida parapsilosis*, dan *Candida guilliermondii* merupakan jenis *Candida* patogen non-*albicans*. *C. tropicalis* dan *C. parapsilosis* merupakan penyebab utama infeksi candida. Jamur ini pada umumnya berasosiasi dengan neutropenia dan merupakan penyebab penyakit berbahaya. *C. guilliermondii* merupakan komponen mikrobiota pada manusia dan ditemukan pada pasien sebagai patogen dengan tingkat infeksi yang rendah. Morfologi *Candida* sp. dapat dilihat pada Gambar 13.^{24, 25}



Gambar 13. *Candida* sp.

2.6.2 Bakteri Uji

Pada penelitian ini digunakan empat jenis bakteri, yaitu *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Escherichia coli*. Morfologi keempat jenis bakteri ini dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Morfologi Bakteri (a) *B. subtilis* (b) *S. aureus* (c) *S. typhimurium* (d) *E. coli*

Genus *Bacillus* termasuk batang besar, Gram positif, aerob, yang membentuk rantai. Kebanyakan anggota genus ini adalah organism saprofit yang lazim terdapat dalam tanah, air, udara dan tumbuh-tumbuhan, seperti *B. subtilis*. Sel-sel khas berukuran 1 x 3-4 μm , mempunyai ujung yang persegi dan tersusun dalam rantai panjang. *B. subtilis* dapat menyebabkan kerusakan pada makanan kaleng yang juga dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia yang mengkonsumsinya.²⁶

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif dan bersifat anaerob fakultatif. *Staphylococcus* berbentuk bulat atau kokus dengan diameter 0,4-1,2 μm . Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat akan memperlihatkan susunan bakteri yang bergerombol seperti buah anggur, sedangkan yang berasal dari perbenihan cair bisa terlihat bentukan kuman yang terlepas sendiri-sendiri, berpasangan atau rantai pendek yang pada umumnya terdiri lebih dari empat sel. Suhu optimal pembiakan *Staphylococcus* antara 35-37 $^{\circ}\text{C}$. pH optimal pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah 7,0-7,5. *Staphylococcus aureus* adalah patogen utama pada manusia. Bakteri ini terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat berupa jerawat, bisul, abses dan luka. Bakteri ini dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan. Saat ini bakteri *Staphylococcus aureus* dikenal sebagai multiresisten antibiotik, artinya bakteri ini tahan terhadap antibiotik. Pada awal 1940-an, bakteri ini pertama kali ditemukan resisten terhadap penisilin. Pada tahun 1980-an, kasus *S. aureus* resisten terhadap metisilin atau dikenal dengan Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) banyak ditemukan di Jepang. Bakteri ini dapat beradaptasi dengan mudah dan cepat terhadap antibiotik.^{1, 27}

Salmonella sering patogen untuk manusia atau binatang. Mereka disebarkan dari binatang dan produk dari binatang ke manusia, dimana mereka menyebabkan enteritis, infeksi sistemik, dan demam enterik. *Salmonella* bervariasi panjangnya. *Salmonella* tumbuh cepat dalam media sederhana. *S. typhimurium* dapat menyebabkan enterokolitis.²⁶

E. coli adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, berderet seperti rantai. *E. coli* banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan. *E. coli* umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru, saluran empedu, dan saluran otak. *E. coli* dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi yang baru lahir, dan infeksi luka.²⁶



III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2011. Bertempat di Laboratorium Fitokimia, Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong, Bogor, Jawa Barat (Lampiran 9).

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah beberapa peralatan gelas (iwaki pyrex), timbangan digital, mikropipet, *laminar air flow*, inkubator, autoklaf, *microtiter plate*, *shaker incubator*, oven, IB-2 *ion coater*, sentrifus, spektrofotometer UV-Pharmaspec 1700, mikroskop elektron tipe JSM-5310LV, *Atomic Absorption Spectroscopy* AA-7000 Shimadzu (Lampiran 2).

3.2.2 Bahan

Larutan uji :

1. Senyawa (+)-2,2'-epitoskirin A (Koleksi Laboratorium Biosain-LIPI)
2. Antibakteri komersial : kloramfenikol dan eritromisin (SIGMA)
3. Antifungi komersial : amfoterisin B (GIBCO) dan nystatin (SIGMA)

Media : medium Muller Hinton Agar (MHA), medium Muller Hinton Broth (MHB), medium Nutrient Agar (NA), medium Potato Dextrose Agar (PDA), medium Sabouraud Broth (SB)

Mikroba uji :

a. Jamur uji

Jamur uji diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi-LIPI. Isolat jamur uji yang digunakan, antara lain :

1. *Candida guilliermondii* LIPIMC 9 (isolasi dari ragi, Bandung)
2. *Candida parapsilosis* LIPIMC 26 (isolasi dari *oil saturated soil*, Semanggi)
3. *Candida parapsilosis* LIPIMC 27 (isolasi dari oncom merah, Sukabumi)
4. *Candida tropicalis* LIPIMC 60 (isolasi dari oncom merah, Cianjur)

b. Bakteri uji

Bakteri diperoleh dari BCC (*Balivet Culture Collection*). Isolat bakteri yang digunakan, antara lain :

1. *Bacillus subtilis* B2558 (isolasi dari mukosa sekum ayam sehat, Bogor)
2. *Staphylococcus aureus* B1452 (isolasi dari susu sapi, Jawa Barat)
3. *Salmonella typhimurium* B2366 (isolasi dari itik, Kalimantan Selatan)
4. *Escherichia coli* B2606 (isolasi dari feses anak babi diare, Kemang)

Bahan kimia lain : akuades, alkohol 50%, 70%, 80%, 95%, dan absolut, dimetil sulfoksida (DMSO), fosfat buffer salin (PBS), glutaraldehid 1%, OsO₄ 1%, *tannin acid* 1%, *buffer coccodylate*, tertier butanol.

3.3 Prosedur Penelitian

Pembuatan Medium

1. Medium SB 1 kali

Serbuk SB ditimbang sebanyak 30 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 30 g/L SB mengandung 5 g pepton kasein, 5 g pepton jaringan hewan, serta 20 g dextrose.

2. Medium SB 2 kali

Serbuk SB ditimbang sebanyak 60 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 60 g/L SB mengandung 10 g pepton kasein, 10 g pepton jaringan hewan, serta 40 g dextrose.

3. Medium NA

Serbuk NA ditimbang sebanyak 23 gram dan dilarutkan dalam air sumur hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 23 g/L NA mengandung 15 g agar, 5 g gelatin pepton, 3 g *beef extract*.

4. Medium PDA

Serbuk PDA ditimbang sebanyak 39 gram dan dilarutkan dalam air sumur hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 39 g/L medium PDA mengandung 4,0 g *potato starch*, 20,0 g dextrose, dan 15,0 g agar.

5. Medium MHB 1 kali

Serbuk MHB ditimbang sebanyak 21 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 21 g/L MHB mengandung 17,5 g *casein acid hydrolysate*, 2 g *beef extract*, 1,5 g *starch*.

6. Medium MHB 2 kali

Serbuk MHB ditimbang sebanyak 42 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 42 g/L MHB mengandung 35 g *casein acid hydrolysate*, 4 g *beef extract*, 3 g *starch*.

7. Medium MHA

Serbuk MHA ditimbang sebanyak 38 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Setelah semua bahan tercampur dipanaskan hingga larut, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebanyak 38 g/L MHA mengandung 2 g *beef extract powder*, 17,5 g *acid digest of casein*, 1,5 g *starch*, 17 g agar.

Persiapan Stock Solution

Stock solution dengan konsentrasi 512 µg/mL dibuat dengan melarutkan 5,12 mg senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A dalam 10 mL DMSO. Begitu pula halnya dengan antibiotik komersial yang digunakan.

Persiapan Inokulum

Jamur diinokulasi pada medium SB selama 18-24 jam dalam *shaker incubator* (27°C) untuk memperoleh suspensi. Kemudian dihitung kandungannya dan

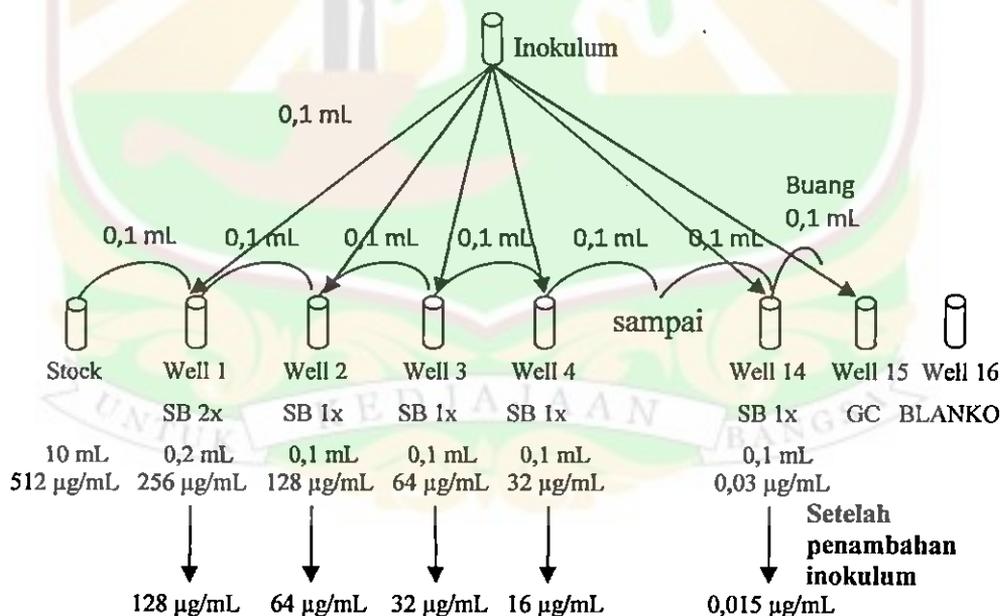
dilakukan pengenceran hingga didapatkan 10^5 CFU/mL. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk bakteri dengan menggunakan medium MHB.

3.3.1 Penentuan Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Persiapan *Plate* untuk MIC (antifungi)

Penentuan MIC dilakukan sebanyak 3x ulangan dengan menggunakan *microtiter plate* dengan 96-well. Pada *well* 1 diisi dengan 0,1 mL medium SB 2x, *well* 2-15 diisi dengan 0,1 mL medium SB 1x, *well* 16 diisi dengan 0,2 mL medium SB 1x (blanko). Kemudian, pada *well* 1 ditambahkan sebanyak 0,1 mL sampel uji dengan konsentrasi 512 $\mu\text{g/mL}$, homogenkan. Ambil sebanyak 0,1 mL campuran pada *well* 1, masukkan pada *well* 2, homogenkan. Begitu seterusnya hingga *well* 14. Pada *well* 14 dibuang sebanyak 0,1 mL campuran (gambar a). Lalu, sebanyak 0,1 mL inokulum ditambahkan pada *well* 1-15 (gambar a). *Well* 15 merupakan growth control (GC) yang berisi 0,1 mL SB 1x dan 0,1 mL inokulum. Skema kerja penentuan MIC dapat dilihat pada Lampiran 1a.²⁸

(a) Pengenceran larutan uji dan penambahan inokulum



Inkubasi *Microtiter Plate*

Microtiter plate kemudian diinkubasi dengan *shaker incubator* selama 18-24 jam pada suhu kamar. Lalu ditentukan nilai MIC dengan pengamatan visual yaitu pada konsentrasi terendah mana *well* masih mempertahankan kebeningannya.

Penentuan Nilai MIC

Untuk penentuan nilai MIC senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A terhadap bakteri juga dilakukan dengan cara yang sama tetapi dengan menggunakan medium MHB.

Konsentrasi terendah dari (+)-2,2'-episitoskirin A dan yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji merupakan nilai MIC. Pengukuran nilai MIC senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A kemudian dibandingkan dengan pengukuran nilai MIC antibiotik komersial.

Mikroba uji dengan nilai MIC terbaik dari perlakuan (+)-2,2'-episitoskirin A diuji lebih lanjut dengan analisis kebocoran protein, asam nukleat, ion, serta pengamatan perubahan morfologi sel.

3.3.2 Analisis Kebocoran Protein dan Asam Nukleat

Analisis kebocoran sel dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dan pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 260 nm (untuk kandungan nitrogen dari asam nukleat) dan panjang gelombang 280 nm (untuk kandungan nitrogen dari protein).

Suspensi jamur uji sebanyak 10 mL, yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dalam media SB, disentrifus dingin (4°C) dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang, lalu endapan sel disuspensikan dengan 9 mL buffer fosfat pH 7,0. Selanjutnya ditambahkan sampel uji sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 1 MIC, 2 MIC, dan kontrol, diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam. Setelah diinkubasi, suspensi disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, lalu disaring untuk memisahkan supernatan dari sel. Cairan supernatan diambil untuk dideteksi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Pharmaspec 1700. Pellet jamur dikoleksi untuk difoto dengan SEM. Untuk bakteri, media yang digunakan adalah MHB. Skema kerja analisis kebocoran protein dan asam nukleat dapat dilihat pada Lampiran 1b.²⁹

3.3.3 Analisis Kebocoran Ion-Ion Logam

Analisis kebocoran ion-ion diukur dalam bentuk ion Ca^{2+} dan K^+ yang keluar dari membran sel jamur akibat perlakuan dengan sampel dan dideteksi dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS).

Analisis kebocoran ion dilakukan pada cairan supernatan yang dipersiapkan seperti pada kebocoran protein dan asam nukleat. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya ion-ion logam yang terdapat pada mikroba uji setelah dikontakkan dengan sampel uji pada konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC. Pengukuran dilakukan di Balai Pasca Panen. Skema kerja analisis kebocoran ion-ion logam dapat dilihat pada Lampiran 1b.³⁰

3.3.4 Analisis Perubahan Morfologi Sel

Pellet jamur yang berasal dari perlakuan sebelumnya direndam dengan glutaral dehid 1% selama minimal 4 jam. Selanjutnya disentrifus dan supernatan dibuang, pellet direndam kembali dengan *tannin acid* 1% dalam *buffer coccodilate* selama minimal 12 jam. Selanjutnya disentrifus dan supernatan dibuang, pellet direndam dalam *buffer coccodilate* selama 10 menit sebanyak 2 kali. Kemudian disentrifus dan supernatan dibuang, pellet lalu direndam dalam 1% larutan osmium tetraoksida selama 1 jam. Kemudian disentrifus kembali dan dibuang supernatannya. Pellet dicuci dengan etanol 50% dingin, dibiarkan selama 10 menit, disentrifus kemudian dibuang supernatannya. Pellet dicuci kembali dengan etanol 50%, 70%, 80%, dan 95% masing-masing selama 10 menit. Kemudian dicuci dengan etanol absolut selama 10 menit sebanyak 2 kali, setelah itu disentrifus lalu buang supernatan. Pellet ditambahkan tertier butanol selama 10 menit dilakukan sebanyak 2 kali. Sedikit tertier butanol ditambahkan pada endapan sel dan apusan sel dioleskan pada slip gelas. Slip gelas yang digunakan dicuci terlebih dahulu dengan etanol absolut, kemudian diolesi dengan sel, dilapisi dengan emas dalam kondisi vakum dan diamati dengan menggunakan mikroskop elektron tipe JSM-5310LV. Skema kerja pengamatan morfologi sel dapat dilihat pada Lampiran 1c.³¹

IV. HASIL DAN DISKUSI

4.1 Penentuan Nilai MIC

Penentuan nilai MIC dengan variasi konsentrasi 0,015 µg/mL hingga 128 µg/mL memperlihatkan kemampuan senyawa (+)-2,2'-episitokirin A menghambat pertumbuhan beberapa mikroba uji. Data hasil penentuan MIC dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai MIC Larutan Uji Dibandingkan Antibiotik Komersial Menghambat Pertumbuhan Mikroba Patogen

Mikroba Uji	Lar. Uji (µg/mL)	Antibiotik komersial (µg/mL)			
		Episitokirin	Nystatin	Amfoterisin B	Kloramfenikol
Jamur					
<i>C. guilliermondii</i> LIPIMC 9	64	8	1	-	-
<i>C. parapsilosis</i> LIPIMC 26	128	128	0,5	-	-
<i>C. parapsilosis</i> LIPIMC 27	16	16	0,5	-	-
<i>C. tropicalis</i> LIPIMC 60	16	8	0,5	-	-
<i>A. flavus</i> *	64	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> *	100	-	-	-	-
Bakteri					
<i>B. subtilis</i> B2558	2	-	-	4	32
<i>S. aureus</i> B1452	0,06	-	-	2	1
<i>S. typhimurium</i> B2366	8	-	-	8	64
<i>E. coli</i> B2606	16	-	-	8	64
<i>S. aureus</i> *	8	-	-	64	64
<i>B. subtilis</i> *	64	-	-	-	-
<i>E. coli</i> *	64	-	-	-	-

Keterangan :

- = tidak diujikan
- * = data didapatkan dari penelitian sebelumnya

Pada pengujian terhadap jamur, (+)-2,2'-episitokirin A memiliki kemampuan yang paling kuat menghambat pertumbuhan jamur *C. tropicalis* LIPIMC 60 dan *C. parapsilosis* LIPIMC 27 dengan nilai MIC 16 µg/mL (Lampiran 3). Senyawa ini memiliki kemampuan menghambat yang sangat lemah terhadap *C. parapsilosis* LIPIMC 26 dengan nilai MIC 128 µg/mL. Pada penelitian sebelumnya, (+)-2,2'-episitokirin A mampu menghambat pertumbuhan

jamur *A. flavus* dan *F. oxysporum* pada konsentrasi masing-masing 64 µg/mL dan 100 µg/mL. Hal ini membuktikan bahwa setiap jenis jamur memiliki kerentanan yang berbeda terhadap senyawa antifungi.

Pada pengujian terhadap bakteri, terlihat bahwa senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki daya antibakteri yang kuat. Senyawa ini memperlihatkan kemampuan yang sangat kuat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* B1452 dengan nilai MIC 0,06 µg/mL (Lampiran 4a). Selain itu, senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *B. subtilis* B2558 dengan nilai MIC 2 µg/mL. Namun, pada pengujian terhadap *E. coli* B2606, senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki kemampuan menghambat yang lemah dengan nilai MIC 16 µg/mL. Dari hasil tersebut, terlihat bahwa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki potensi yang lebih baik sebagai antibakteri.

Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki kemampuan menghambat yang lebih kuat pada pengujian terhadap spesies bakteri yang sama pada penelitian sebelumnya. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 8 µg/mL, serta *B. subtilis*, dan *E. coli* pada konsentrasi 64 µg/mL.

Sebagai pembandingan dalam penentuan MIC ini digunakan antibiotik komersial yang sudah sering digunakan, yaitu nystatin, amfoterisin B, kloramfenikol, dan eritromisin. Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A mampu bersaing dengan antibiotik komersial tersebut. Pada pengujian terhadap *S. aureus* B1452, terlihat bahwa senyawa ini jauh lebih kuat dibandingkan dengan antibakteri komersial yaitu kloramfenikol dan eritromisin dengan nilai MIC masing-masing 2 µg/mL dan 1 µg/mL. Begitu pula halnya dengan pengujian terhadap *B. subtilis* B2558 dimana antibakteri komersial memperlihatkan kemampuan yang lebih lemah dibandingkan dengan senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A. Pada pengujian terhadap *S. typhimurium* B2366, senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A memiliki kemampuan yang sama dengan kloramfenikol dengan nilai MIC 8 µg/mL. Begitu pula halnya pada pengujian terhadap jamur, senyawa ini memiliki kemampuan yang sama dengan nystatin pada perlakuan terhadap *C. parapsilosis* LIPIMC 26 dan *C. parapsilosis* LIPIMC 27.

Dari penelitian ini, penentuan MIC memperlihatkan bahwa bakteri uji Gram positif (*B. subtilis* B2558 dan *S. aureus* B1452) lebih sensitif terhadap perlakuan dengan (+)-2,2'-episitokirin A maupun antibakteri komersial jika dibandingkan dengan bakteri uji Gram negatif (*E. coli* B2606 dan *S. typhimurium* B2366). Ketahanan bakteri Gram negatif terhadap senyawa antibakteri diduga berhubungan dengan perbedaan struktur dinding sel bakteri dimana dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri gram positif. Pada Gram negatif terdapat membran luar lipopolisakarida (LPS) yang berfungsi sebagai pelindung. Sedangkan pada bakteri Gram positif, LPS tidak ditemukan sehingga tidak mempunyai sistem penghalang dan senyawa antimikroba baik yang bersifat hidrofilik maupun hidrofobik dapat masuk membran sel.¹⁸

4.2 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa (+)-2,2'-Episitokirin A

Mekanisme kerja senyawa (+)-2,2'-episitokirin A dianalisis dari data pengukuran absorban pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, pengukuran ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+), serta perubahan morfologi sel. Mikroba uji yang digunakan didasarkan pada hasil MIC yang menunjukkan kemampuan menghambat yang paling baik, yaitu *C. tropicalis* LIPIMC 60 dan *S. aureus* B 1452.

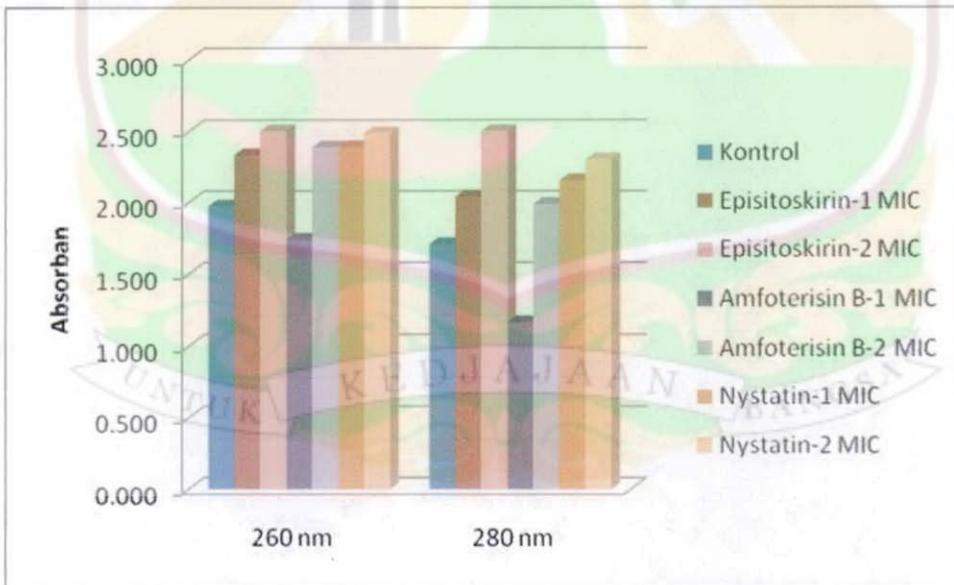
Pemberian senyawa antimikroba terhadap mikroba uji pada konsentrasi MIC dapat menyebabkan kebocoran sel yang ditandai dengan terjadinya peningkatan nilai absorban pada panjang gelombang 260 nm (kebocoran asam nukleat) dan 280 nm (kebocoran protein). Spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dapat mendeteksi purin, pirimidin, dan ribonukleotida sedangkan pada 280 nm dapat mendeteksi tirosin dan triptofan yang terdapat pada protein. Kerusakan sel juga dapat dilihat dari peningkatan konsentrasi ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+) yang terkandung pada supernatan melalui pengukuran dengan menggunakan AAS (Lampiran 7 dan 8). Kebocoran sel mengindikasikan terjadinya kerusakan pada membran sel. Hal ini didukung juga dengan pengamatan perubahan morfologi sel.³²

4.2.1 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A Terhadap *C. tropicalis* LIPIMC 60

a) Hasil Pengukuran UV-Vis

Hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dari supernatan jamur uji *C. tropicalis* LIPIMC 60 yang telah dikontakkan dengan senyawa antimikroba dapat dilihat pada Lampiran 5a.

Terhadap jamur uji *C. tropicalis* LIPIMC 60, senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A dengan konsentrasi 1 MIC maupun 2 MIC memperlihatkan kenaikan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Peningkatan nilai absorbansi sebanding dengan peningkatan konsentrasi MIC yang diberikan. Hal ini menunjukkan terjadinya peningkatan konsentrasi asam nukleat (260 nm) dan protein (280 nm) yang keluar dari sel jamur uji. Namun, pada perlakuan amfoterisin B pada konsentrasi 1 MIC memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada konsentrasi 2 MIC terjadi peningkatan jika dibandingkan dengan kontrol dan konsentrasi 1 MIC (Gambar 15). Hal ini mengindikasikan bahwa amfoterisin B dapat merusak sel pada konsentrasi lebih tinggi dari nilai MIC.



Gambar 15. Hasil Pengukuran Absorbansi Asam Nukleat (260 nm) dan Protein (280 nm) pada Jamur Uji *C. tropicalis* LIPIMC 60

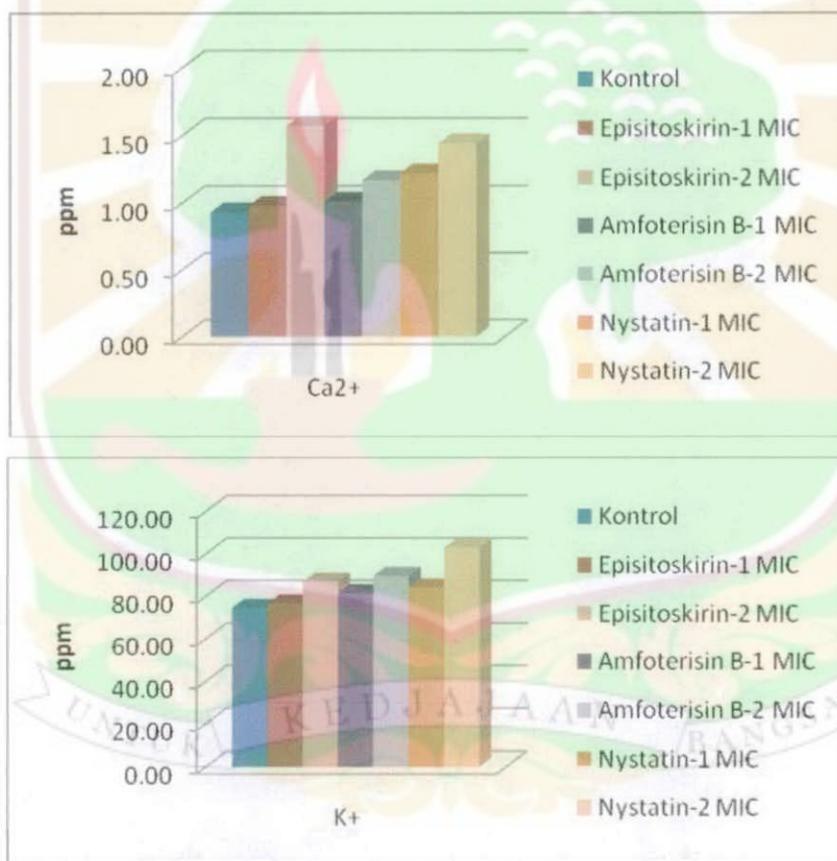
Mekanisme kerja nystatin dan amfoterisin B adalah merusak membran sel dengan cara berikatan pada ergosterol sehingga menyebabkan peningkatan

permeabilitas membran. Hal ini terbukti dengan meningkatnya konsentrasi asam nukleat dan protein yang keluar dari dalam sel.

b) Hasil Pengukuran AAS

Hasil pengukuran ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+) dari supernatan jamur uji *C. tropicalis* LIPIMC 60 yang telah dikontakkan dengan senyawa antimikroba dapat dilihat pada Lampiran 5b.

Perlakuan (+)-2,2'-episitoskirin A terhadap *C. tropicalis* LIPIMC 60 menyebabkan peningkatan konsentrasi ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+). Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, maka konsentrasi ion juga akan semakin meningkat (Gambar 16). Begitu pula halnya dengan perlakuan antifungi komersial.



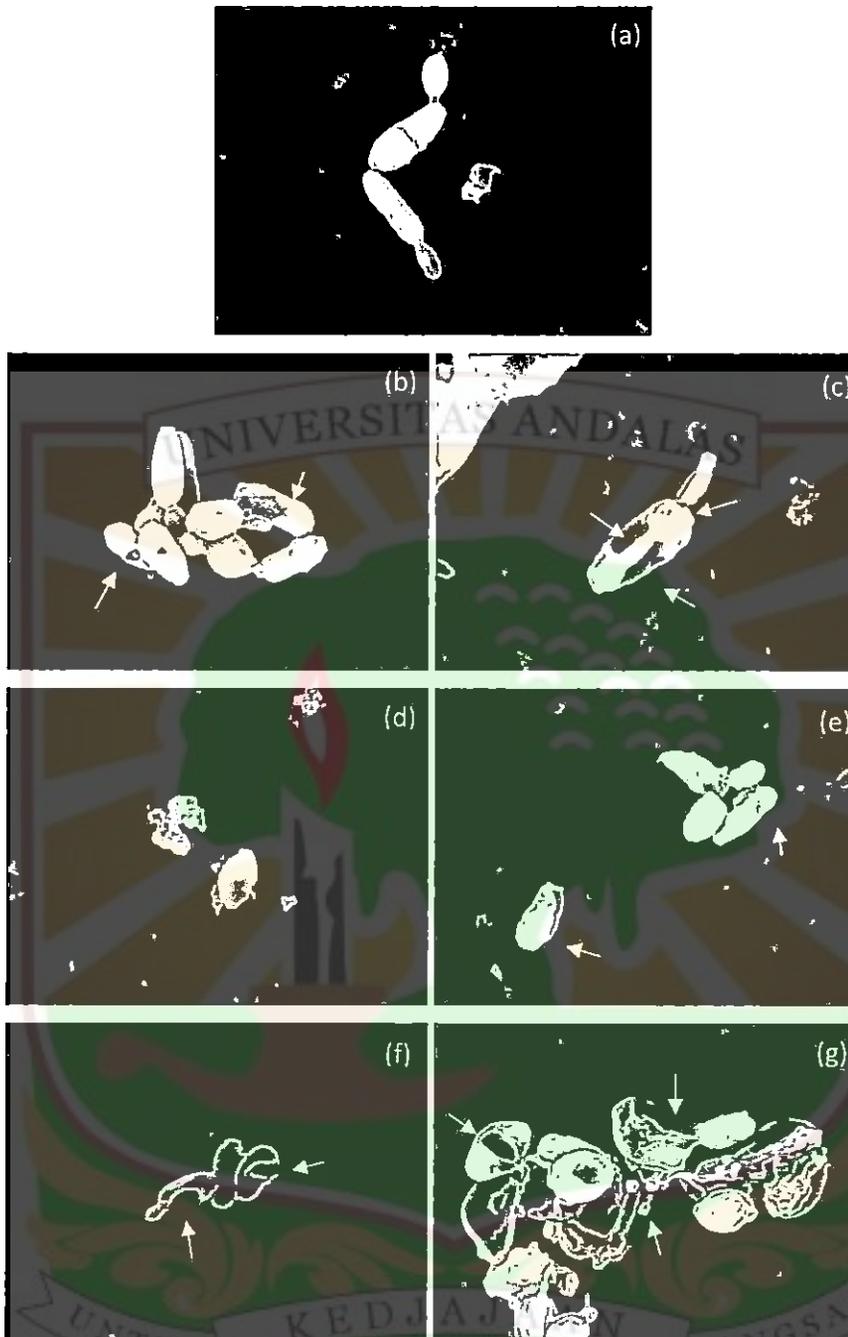
Gambar 16. Hasil Pengukuran Konsentrasi Ion-ion Logam (Ca^{2+} dan K^+) dari Jamur Uji *C. tropicalis* LIPIMC60

Kestabilan permeabilitas membran sel bakteri dipengaruhi oleh konsentrasi ion K^+ pada cairan sitoplasma. Sementara ion Ca^{2+} berfungsi untuk menjaga kestabilan membran. Dengan adanya kebocoran ion, maka kestabilan membran akan terganggu yang akhirnya akan menyebabkan kematian mikroba.

Meningkatnya jumlah kandungan sel yang ditemukan pada permukaan luar sel menandakan terjadinya kerusakan membran sel atau perubahan permeabilitas membran sel. Namun, peningkatan nilai absorban baik asam nukleat maupun protein serta ion-ion logam tidak signifikan pada kedua konsentrasi MIC.^{32,33}

e) Hasil Pengamatan SEM

Perubahan morfologi sel *C. tropicalis* LIPIMC 60 akibat beberapa perlakuan dapat dilihat pada Gambar 20. Sel *C. tropicalis* tanpa perlakuan berbentuk lonjong dengan permukaan yang mulus (Gambar 17a). Pada perlakuan (+)-2,2'-episitokirin A dengan konsentrasi 1 MIC memperlihatkan kerusakan sel yang ditandai sel terlihat sedikit mengkerut (Gambar 17b). Pada dosis 2 MIC, kerusakan yang terjadi semakin bertambah dimana sel mengkerut dan terbentuk tonjolan pada permukaan sel (Gambar 17c). Kerusakan yang terjadi semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi yang diberikan. Bahkan, pada perlakuan nystatin dengan konsentrasi 2 MIC (Gambar 17g), sel mengalami perubahan yang sangat signifikan dibandingkan dengan konsentrasi 1 MIC (Gambar 17f). Pada perlakuan ini, bentuk sel terlihat tidak beraturan dan memperlihatkan adanya tonjolan-tonjolan. Perlakuan amfoterisin B dengan konsentrasi 1 MIC (Gambar 17d) tidak memberikan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Namun, pada konsentrasi 2 MIC terlihat perubahan morfologi sel yang ditandai dengan kerutan pada sel (Gambar 17e).



Gambar 17. Perubahan Morfologi Sel Jamur Uji *C. tropicalis* LIPIMC 60. Tanda panah menunjukkan kerusakan yang terlihat oleh perlakuan (a) kontrol (b) (+)-2,2'-episitokirin A 1 MIC (c) (+)-2,2'-episitokirin A 2 MIC (d) amfoterisin B 1 MIC (e) amfoterisin B 2 MIC (f) nystatin 1 MIC (g) nystatin 2 MIC

Perubahan morfologi sel *C. tropicalis* terlihat sama dengan perubahan morfologi sel yang mengalami apoptosis. Morfologi sel yang mengalami apoptosis akan terlihat mengkerut dan membentuk tonjolan, dimana ukuran sel

akan mengecil, sitoplasma memadat, sedangkan organela tetap normal. Morfologi sel yang mengalami apoptosis diperlihatkan pada Gambar 18.



Gambar 18. Sel yang Mengalami Apoptosis

Tonjolan yang terbentuk merupakan indikasi salah satu proses yang terjadi pada apoptosis dimana sel akan mengalami *budding* yang kemudian akan terlepas menjadi badan apoptosis. Pada peristiwa apoptosis sel tidak mengalami kebocoran.

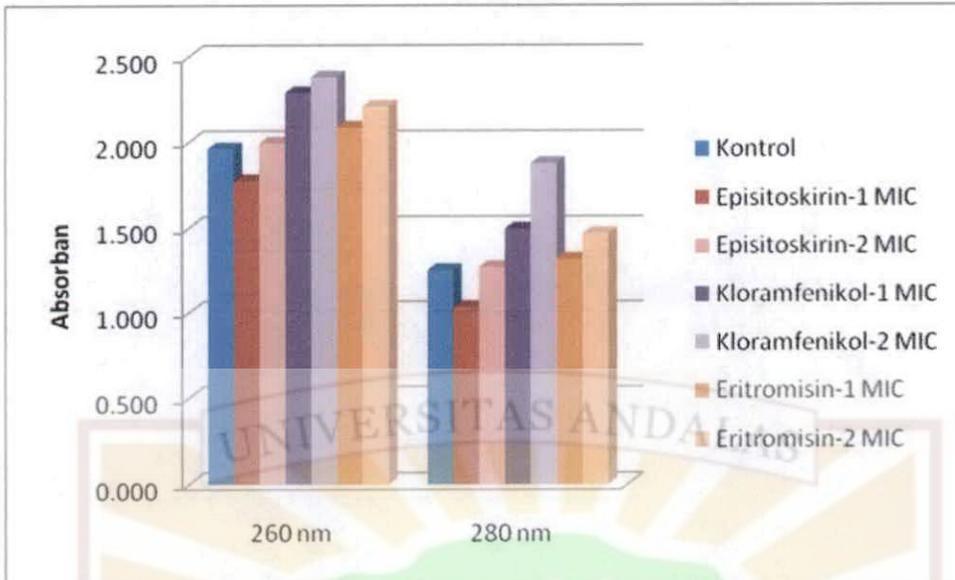
Data yang didapatkan memperlihatkan bahwa mekanisme kerja senyawa (+)-2,2'-episitokirin A terhadap jamur uji *C. tropicalis* LIPIMC 60 adalah tidak merusak dinding sel, dimana terlihat dari tidak adanya kebocoran sel dan lubang yang teramati pada pengamatan SEM.

4.2.2 Analisis Mekanisme Kerja Senyawa (+)-2,2'-Episitokirin A Terhadap *S. aureus* B1452

a) Hasil Pengukuran UV-Vis

Hasil pengukuran absorban pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dari supernatan bakteri uji *S. aureus* B1452 yang telah dikontakkan dengan senyawa antimikroba dapat dilihat pada Lampiran 6a.

Terhadap mikroba uji *S. aureus* B1452, senyawa (+)-2,2'-episitokirin A pada konsentrasi 1 MIC maupun 2 MIC tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan tidak adanya metabolit seluler (asam nukleat dan protein) yang keluar dari dalam sel. Sedangkan perlakuan dengan antibakteri komersial memperlihatkan peningkatan absorban yang tidak signifikan pada konsentrasi 1 MIC maupun 2 MIC. Pengaruh pemberian larutan uji terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Gambar 19.



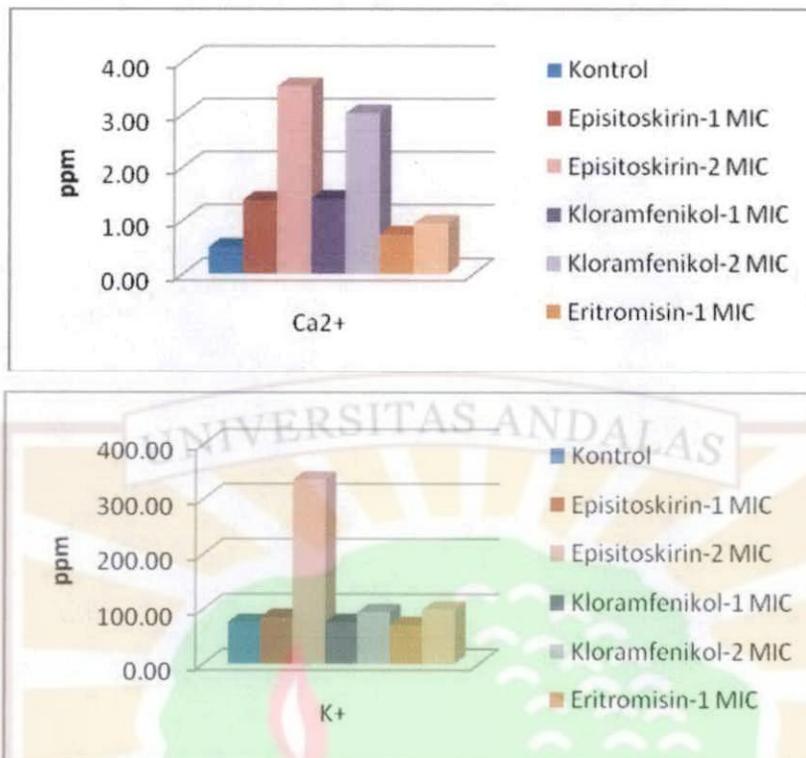
Gambar 19. Hasil Pengukuran Absorban Asam Nukleat (260 nm) dan Protein (280 nm) pada Bakteri Uji *S. aureus* B1452

Mekanisme kerja eritromisin dan kloramfenikol adalah menghambat sintesis protein¹⁷. Dari hasil yang didapatkan, terlihat bahwa kedua antibakteri tersebut tidak menyebabkan kebocoran sel.

b) Hasil Pengukuran AAS

Hasil pengukuran ion-ion logam (Ca^{2+} dan K^+) dari supernatan bakteri uji *S. aureus* B1452 yang telah dikontakkan dengan senyawa antimikroba dapat dilihat pada Lampiran 6b.

Pada perlakuan terhadap *S. aureus* B1452, juga terjadi peningkatan konsentrasi ion-ion logam (Gambar 20). Perlakuan dengan senyawa (+)-2,2'-episitokirin A pada konsentrasi 1 MIC memberikan peningkatan konsentrasi ion yang tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Pada konsentrasi 2 MIC, konsentrasi ion baik Ca^{2+} maupun K^+ meningkat. Peningkatan ini mengindikasikan bahwa kerusakan sel semakin bertambah dengan ditingkatkannya konsentrasi MIC yang diberikan.

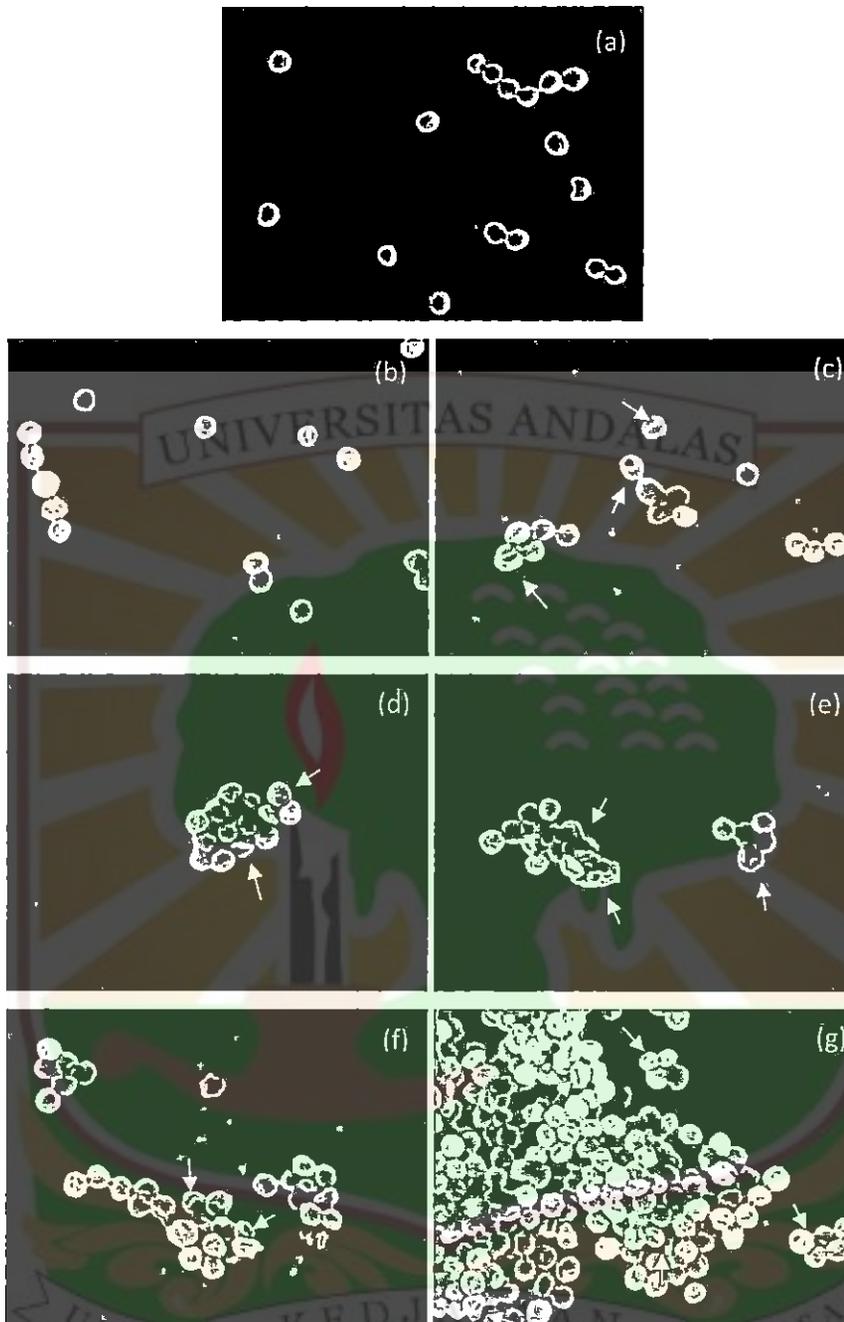


Gambar 20. Hasil Pengukuran Konsentrasi Ion-ion Logam (Ca^{2+} dan K^+) dari Bakteri Uji *S. aureus* B1452

Peningkatan absorban maupun konsentrasi ion-ion logam pada perlakuan senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A dan antibakteri komersial tidak memperlihatkan adanya perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak terjadi kebocoran sel pada bakteri uji.

c) Hasil Pengamatan SEM

Perubahan morfologi sel *S. aureus* B1452 akibat beberapa perlakuan dapat dilihat pada Gambar 21. Sel *S. aureus* dalam keadaan normal berbentuk bulat dengan permukaan yang licin seperti terlihat pada Gambar 21a. Perlakuan dengan konsentrasi 1 MIC senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A (Gambar 21b) tidak memperlihatkan perubahan morfologi sel yang signifikan. Namun, pada konsentrasi 2 MIC terlihat adanya pengkerutan pada permukaan sel (Gambar 21c). Begitu pula halnya dengan perlakuan antibakteri komersial (Gambar 21e-g). Gambar 21e memperlihatkan kerusakan yang diakibatkan perlakuan kloramfenikol dengan konsentrasi 2 MIC, dimana permukaan sel terlihat kasar dan mengkerut. Secara umum, kerusakan yang terjadi pada sel *S. aureus* tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 21. Perubahan Morfologi Sel pada Bakteri Uji *S. aureus* B1452. Tanda panah menunjukkan kerusakan akibat perlakuan (a) kontrol (b) (+)-2,2'-episitokirin A 1 MIC (c) (+)-2,2'-episitokirin A 2 MIC (d) kloramfenikol 1 MIC (e) kloramfenikol 2 MIC (f) eritromisin 1 MIC (g) eritromisin 2 MIC

Perubahan morfologi sel *S. aureus* B1452 juga memperlihatkan ciri-ciri yang sama dengan sel yang mengalami apoptosis. Pada peristiwa apoptosis, sel yang rusak akan dieliminasi dan difagosit oleh sel tetangga sehingga tidak terjadi penularan. Oleh sebab itu, peristiwa apoptosis menyebabkan keseimbangan sel

agar tetap normal terjaga. Dalam kasus pengujian terhadap *S. aureus* B1452, hal yang sama juga terjadi dimana tidak semua sel yang mengalami kerusakan.

Data yang didapatkan memperlihatkan bahwa mekanisme kerja senyawa (+)-2,2'-episisoskirin A terhadap bakteri uji *S. aureus* B1452 adalah tidak merusak dinding sel, dimana terlihat dari tidak adanya kebocoran sel dan lubang yang teramati pada pengamatan SEM.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A terbukti memiliki aktivitas yang relatif lebih kuat sebagai antibakteri dibandingkan dengan aktivitasnya sebagai antijamur. Senyawa ini memiliki kemampuan menghambat yang lemah terhadap jamur *C. tropicalis* LIPIMC 60 dengan nilai MIC 16 µg/mL dan kemampuan menghambat yang sangat kuat terhadap bakteri *S. aureus* B1452 dengan nilai MIC 0,06 µg/mL.
2. Mekanisme kerja (+)-2,2'-episitoskirin A adalah tidak merusak membran sel yang ditandai dengan tidak adanya kebocoran asam nukleat, protein, dan ion-ion logam, serta morfologi yang tidak memperlihatkan kebocoran sel. Kematian sel terjadi melalui proses apoptosis.

5.2 Saran

Melihat hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diajukan beberapa saran untuk kemajuan penelitian selanjutnya, yaitu :

1. Perlu dilakukan pengembangan senyawa (+)-2,2'-episitoskirin A sebagai antimikroba.
2. Perlu dilakukan analisis mekanisme kerja yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

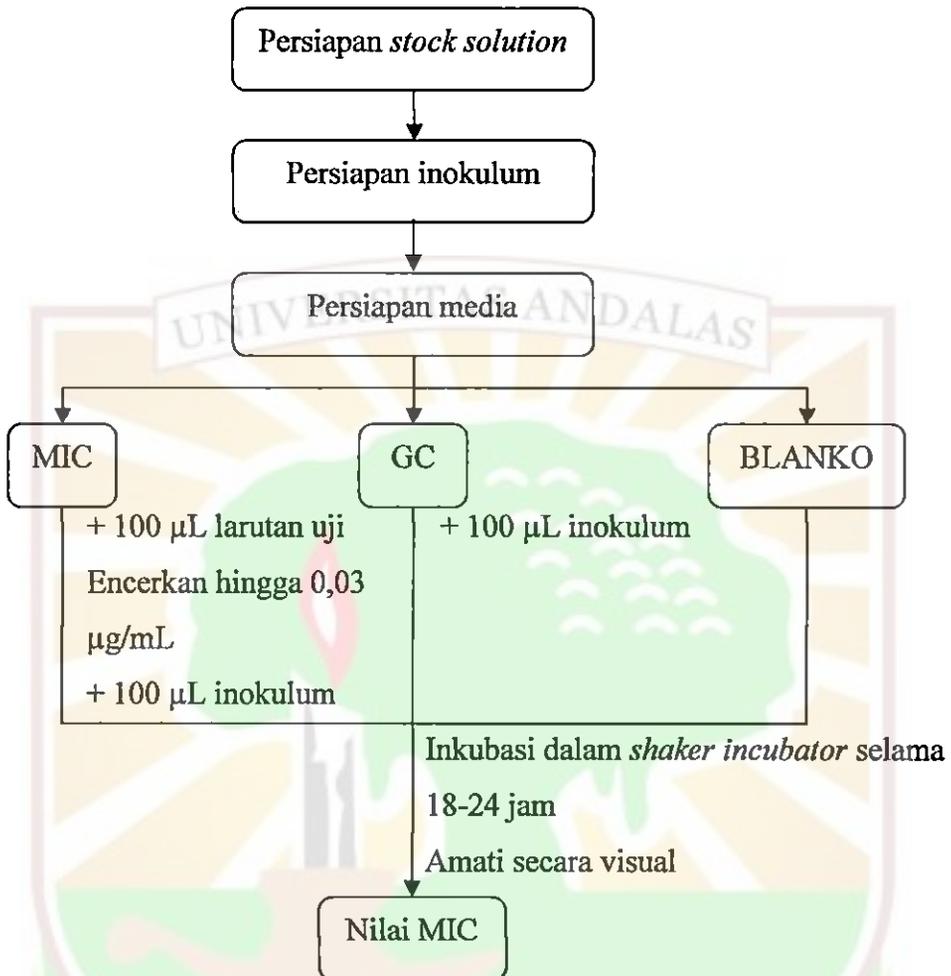
1. Smith AL. *Principle of Microbiology Seventh Edition*. The C. V. Mosby Company. Saint Louis. (1973).
2. Radji, M. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. Review Artikel. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No. 3 : 113-126. (2005)
3. Clay K and C. Schardl. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist*, Vol. 160. (2002)
4. Strobel G and B. Daisy. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *American Society for Microbiology*, Vol. 67, No. 4. (2003)
5. Agusta, A. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB. Bandung. (2009).
6. Ilyas M., A. Kanti, Y. Jamal, Hertina, and A. Agusta. Biodiversity of Endophytic Fungi Associated with *Uncaria gambier roxb.* (rubiaceae) from West Sumatra. *Biodiversitas* : 23-28. (2008).
7. Astuti, D. Aktivitas Antibiotik (+)-2,2'-Episitoskirin A dari Jamur Endofit *Diaporthe sp.* GNPB 10 yang Diisolasi dari Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier Roxb* : Rubiaceae). Skripsi sarjana kimia. Universitas Andalas (2009).
8. Megawati, R. Uji Aktivitas Antifungi (+)-2,2'-Episitoskirin A Terhadap *Fusarium oxysporum*. Skripsi sarjana farmasi. Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta (2010).
9. Kulsum, U. Uji Mekanisme Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Oleh (+)-2,2'-Episitoskirin A. Skripsi sarjana farmasi. Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta (2009).
10. Dhalimi, A. Permasalahan Gambir (*Uncaria gambier L.*) di Sumatera Barat dan Alternatif Pemecahannya. *Perspektif* : Vol 5, Nomor 1 : 46-59. (2006).
11. http://www.bridgat.com/files/Gambir_Extract_1.jpg. diakses 12 Mei 2011.
12. Tan RX, Hua WZ, dan Yong CS. Biology and Chemistry Endophytes. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 753-771. (2006).
13. Carroll GC. Fungal Associates of Woody Plants as Insect Antagonists in Leaves and Stems. *Microbial Mediation of Plants-Herbivore Interactions* (9) : 253-267. (1991).

14. Harrison L., C. Teplow., M. Rinaldi., and GA Strobel. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas Syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2857-2865. (1991).
15. Agusta A., K Ohashi, dan H Shibuya. Bisanthraquinone Metabolites Produced by The Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(4), 579-582. (2006b).
16. Putri DF. Studi Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A dan (+)-1,1'-Bislunatin dengan DNA. Skripsi sarjana kimia. Universitas Andalas Padang. (2010).
17. Gunawan SG., R. Setiabudy, Nafrialdi, Elysabeth. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Gaya Baru : Jakarta. (2007).
18. Suliantari. Aktivitas Antibakteri dan Mekanisme Penghambatan Ekstrak Sirih hijau (*Piper betle* Linn) Terhadap Bakteri Patogen Pangan. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. (2009).
19. Erhardt, Peter and Ambrus Toth. *Apoptosis Method and Protocol*, 2th edition. Spinger Protocols Method and Molecular Biologi 559. Humana Press. New York. (2009).
20. Lumongga, F. Apoptosis. Departemen Patologi Anatomi. USU Repository. (2008).
21. Simatupang, M. *Candida Albicans*. Departemen Mikrobiologi. USU Repository. (2008).
22. Jawetz, Melnick, and Adelberg's. *Mikrobiologi Kedokteran Buku 2*. Penerbit Salemba Medika. (2005).
23. Warnock, DW. Trend in The Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 48, 1-12. (2007).
24. Cuomo CA and M. Kellis. Evolution of Pathogenicity and Sexual Reproduction in Eight *Candida* Genomes. *Nature*, Vol. 459 : 657-662. (2009).
25. Pasqualotto AC., AGV Antunes, and LC Severo. *Candida guilliermondii* As The Aetiology of Candidosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48 (3) : 123-127, May-June. (2006).
26. Jawetz, Melnick, and Adelberg's. *Mikrobiologi Kedokteran Buku 1*. Penerbit Salemba Medika. (2005).
27. Suzuki J., G. Yoshimura, N. Kadomoto, M. Kuramoto, and K. Kozai. Long-Term Periodical Isolation of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus* (MRSA) from Japanese Children's Oral Cavities. *Pediatric Dental Journal* 17(2) : 127-130. (2007).
28. Vogler B and Williams NS. Bioassays for Activity. *Natural Products from Plants, Second Edition* : 390-391. (2006).
29. Carson CF, Brian JM, Riley TV. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lyses, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 6 :1914-1920. (2002).
30. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Guestafson JE, Warmington JR, and Wyllie SG. The Mode of Antibacterial Action of The Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil). *J of App Microbiol* 88: 170-175. (2000).
31. Duffur JH and I Campbell. *Yeast : A Paractical Approach*. IRL Press, England. 46-47. (1988).
32. Miksusanti. Kajian Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Temu Kunci dan Aplikasinya dalam Film Edibel Antibakteri. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. (2008).
33. Burt, S. Essential Oils : Their Antibacterial Properties and Potential Application in Foods-A Review. *International Journal of Food Microbiology* 94 : 223-253. (2004).

Lampiran 1. Skema Kerja

a. Penentuan Nilai MIC

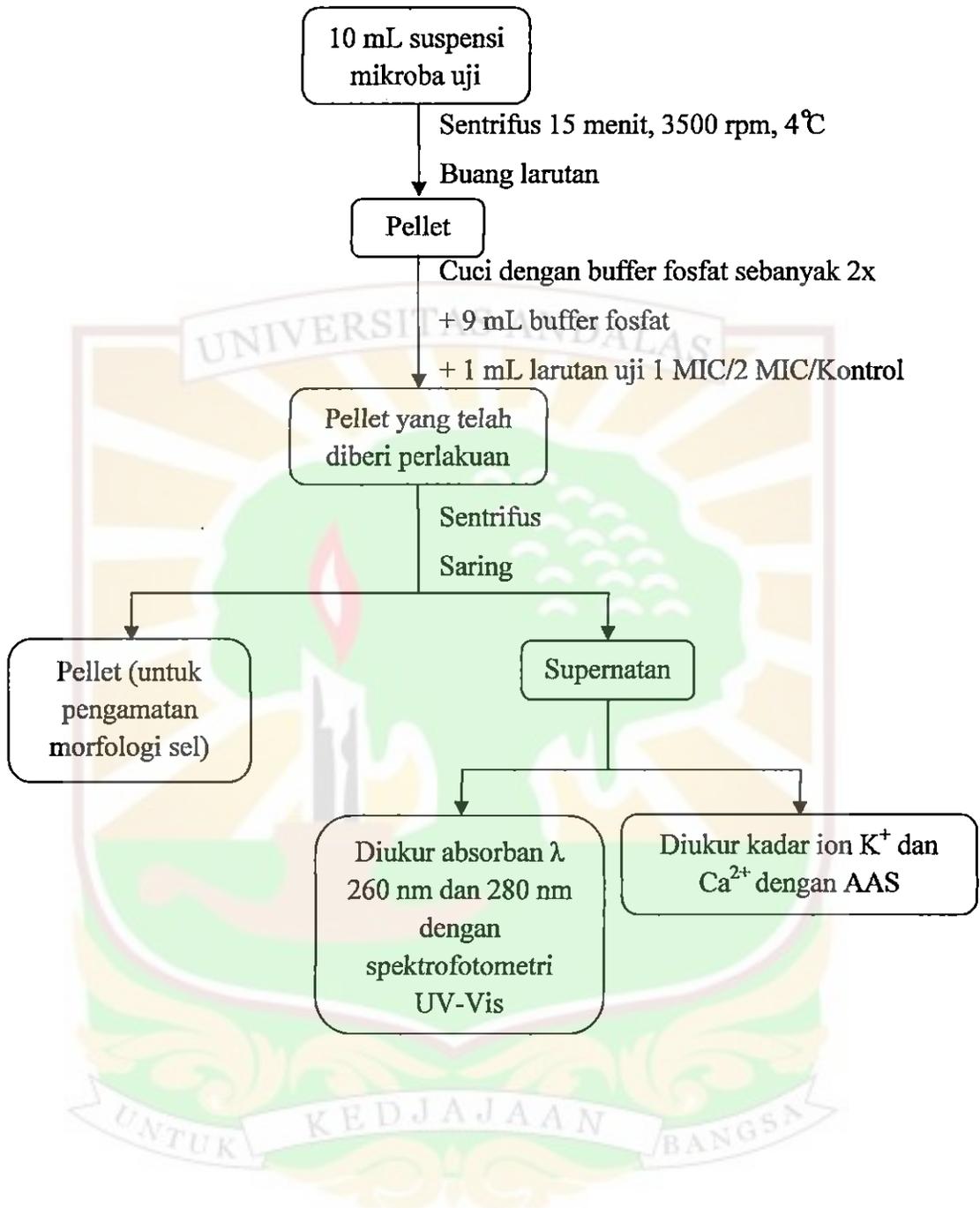


Keterangan :

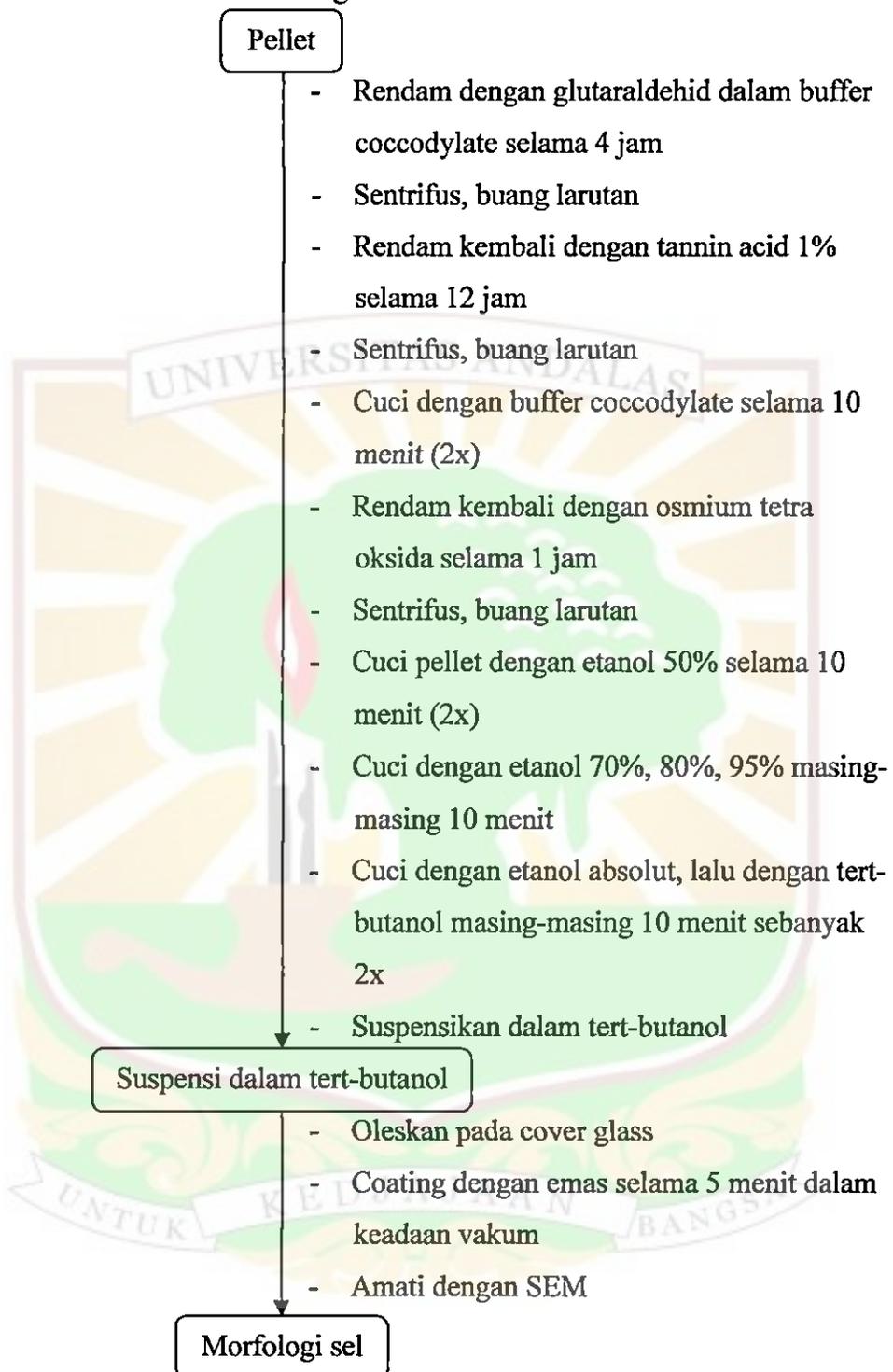
MIC : *minimum inhibitory concentration*

GC : *growth control*

b. Analisis Kebocoran Protein, Asam Nukleat, dan Ion



c. Analisis Perubahan Morfologi Sel



Lampiran 2. Alat-alat yang Digunakan



SEM



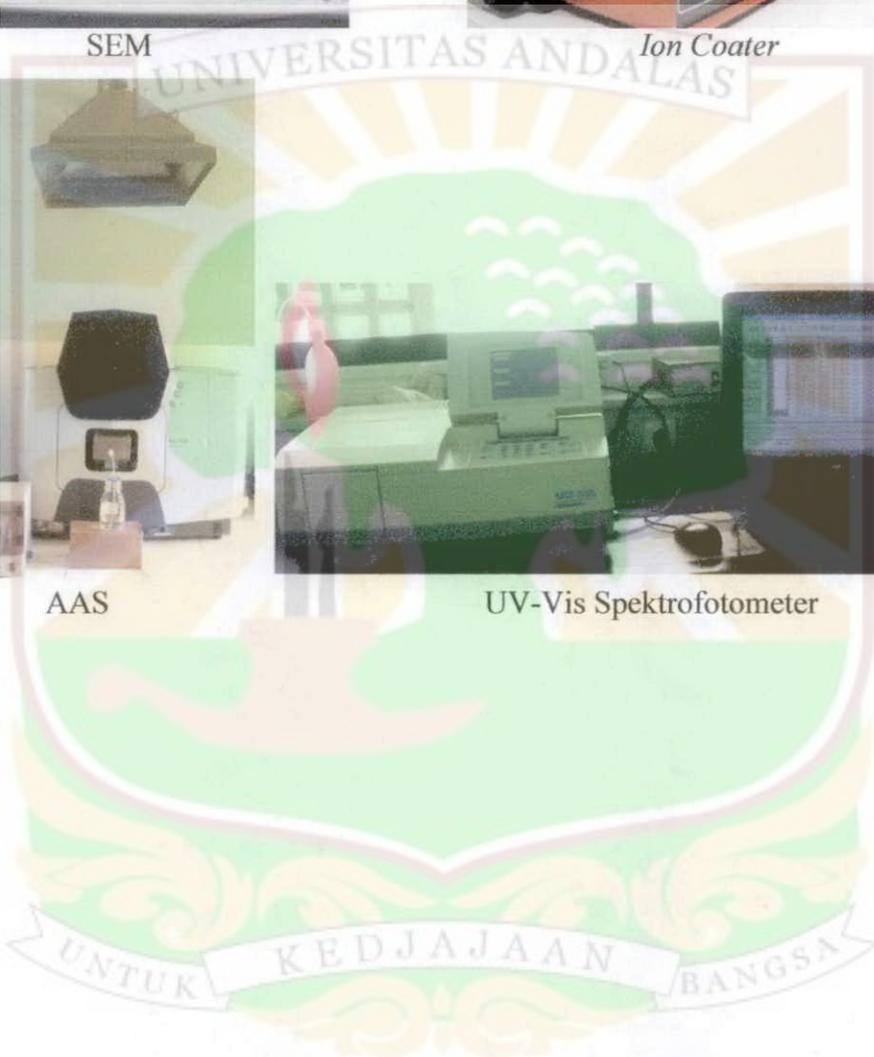
Ion Coater



AAS



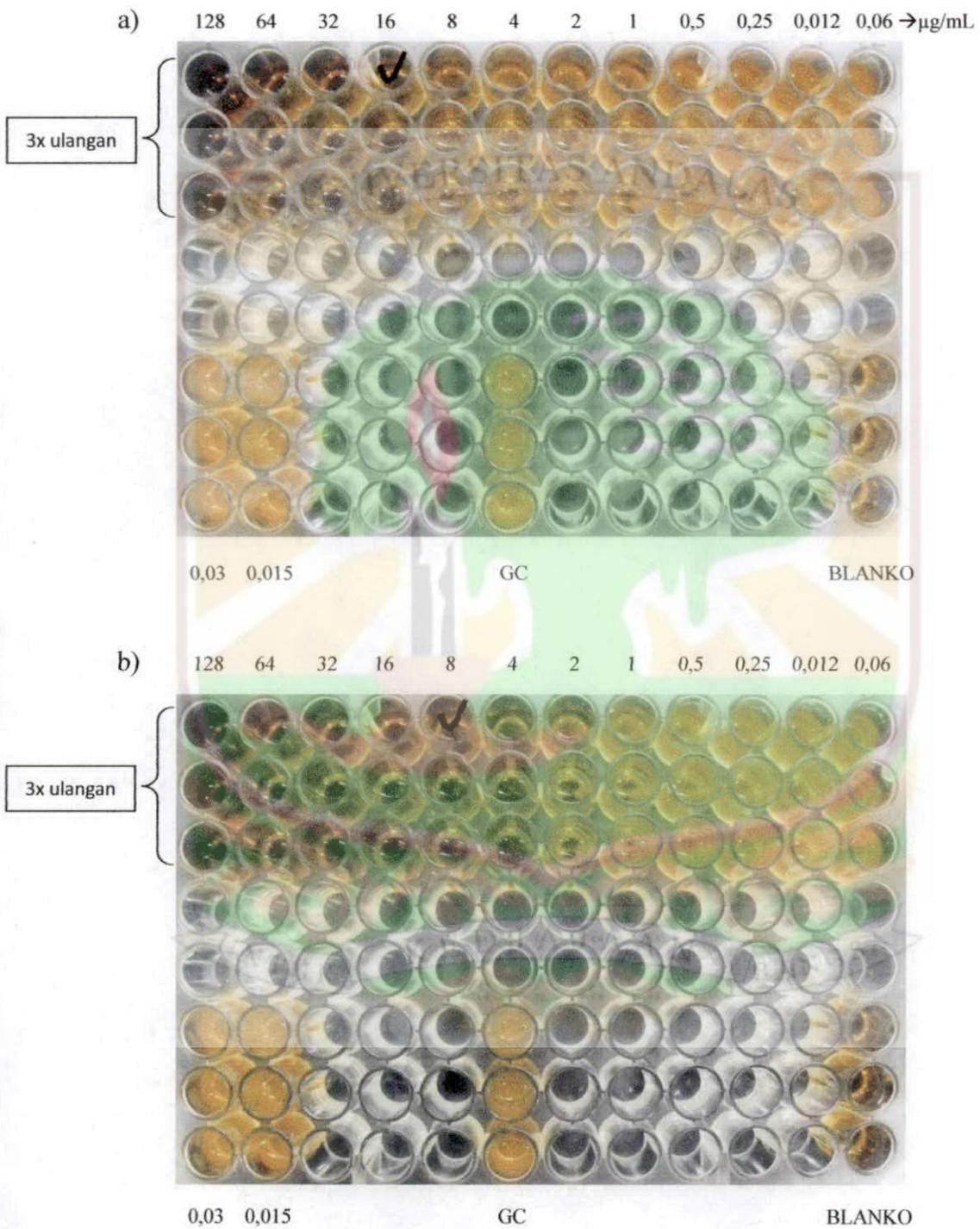
UV-Vis Spektrofotometer



Lampiran 3. Hasil Penentuan MIC *C. tropicalis* LIPIMC 60 dengan Perlakuan :

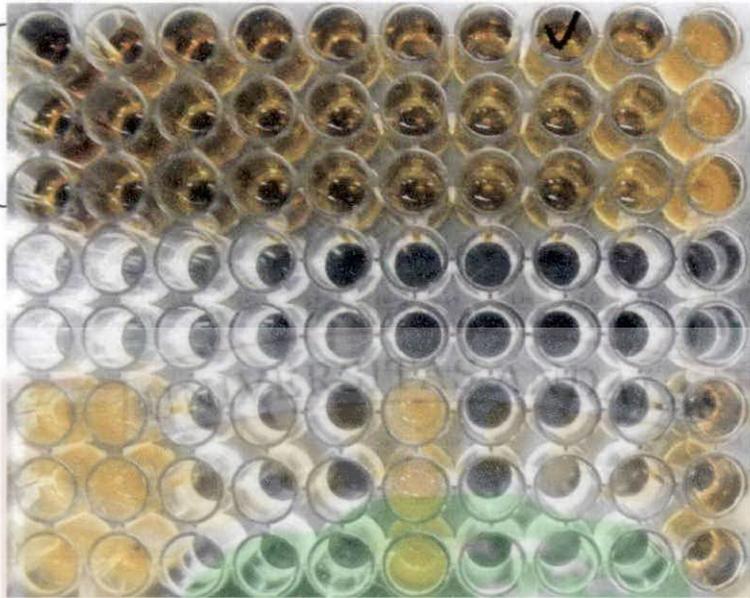
a) 2,2'-Episitokirin A, b) Nystatin, c) Amfoterisin B

Tanda (✓) menunjukkan well yang masih mempertahankan kebeningannya (nilai MIC)



c) 64 32 16 8 4 2 1 0,5 0,25 0,012

3x ulangan



0,06 0,03

GC

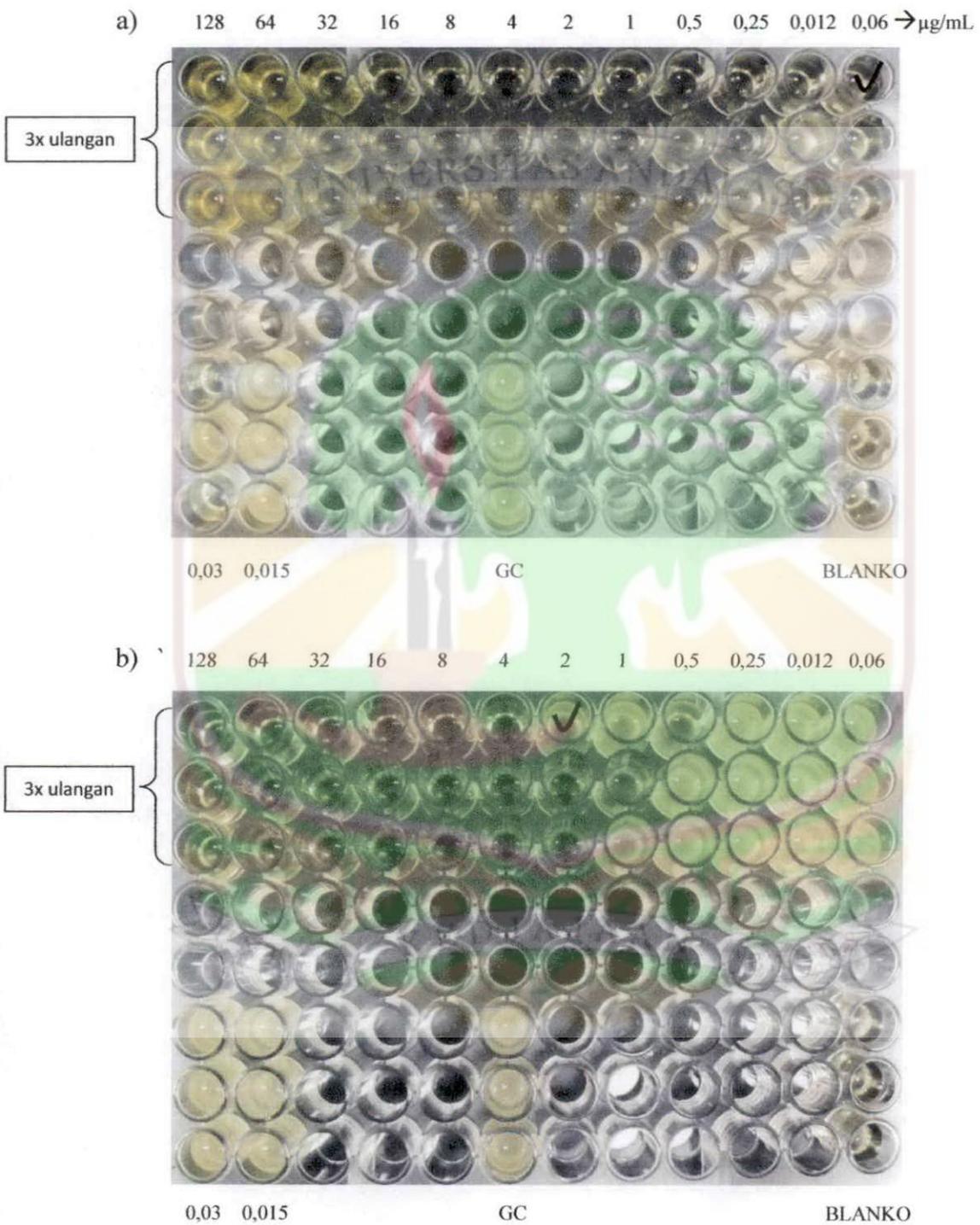
BLANKO



Lampiran 4. Hasil Penentuan MIC *S. aureus* B1452 dengan Perlakuan :

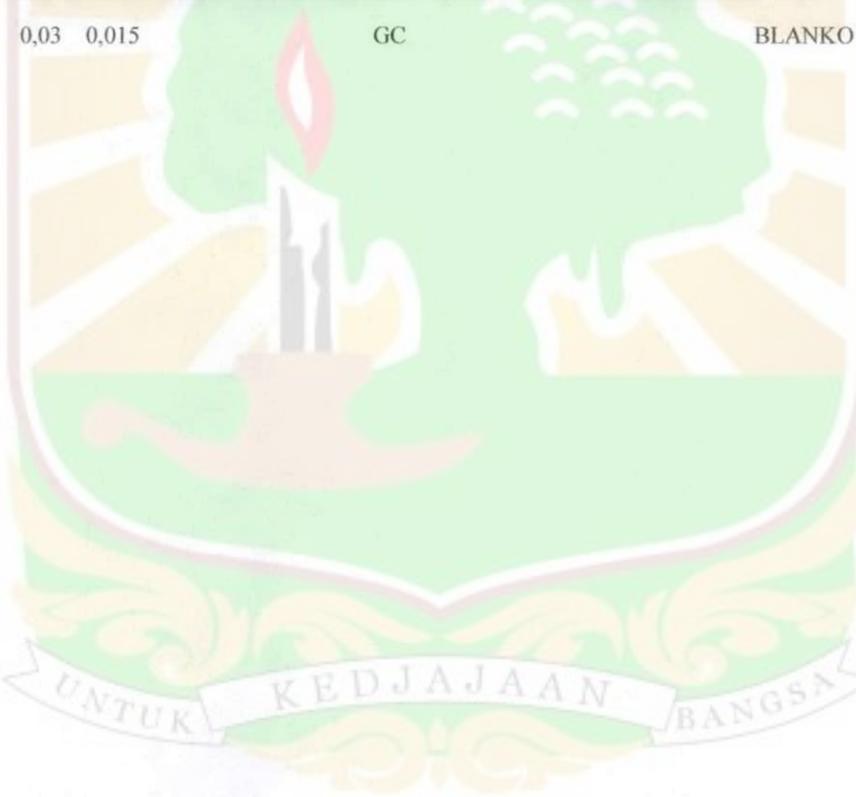
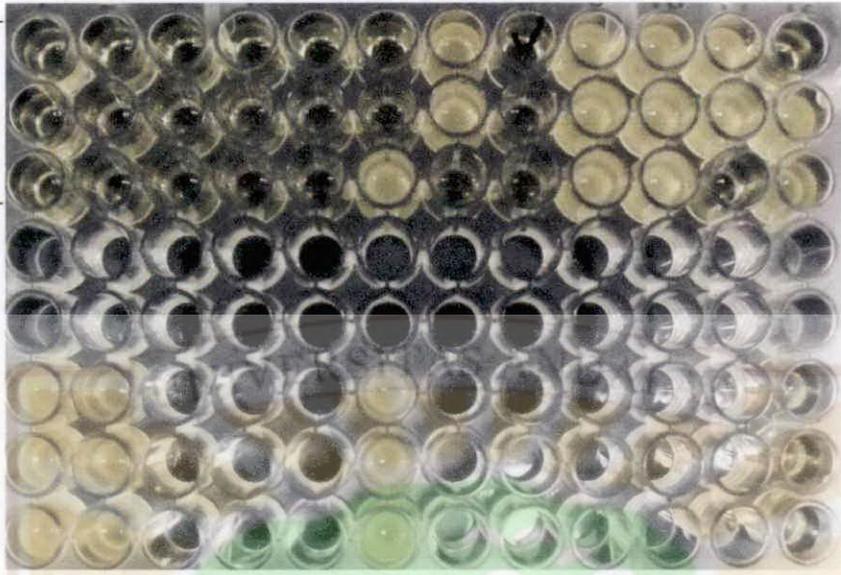
a) (+)-2,2'-Episitokirin A, b) Kloramfenikol, c) Eritromisin

Tanda (✓) menunjukkan well yang masih mempertahankan kebeningannya (nilai MIC)



c) 128 64 32 16 8 4 2 1 0,5 0,25 0,012 0,06

3x ulangan



Lampiran 6. Hasil Pengukuran Terhadap Bakteri Uji *S. aureus* B1452

a) Pengukuran UV-Vis

Konsentrasi Lar. Uji	Nilai Absorban	
	260 nm	280 nm
Kontrol	1,964	1,253
Episitoskirin-1 MIC	1,778	1,034
Episitoskirin-2 MIC	1,995	1,271
Kloramfenikol-1 MIC	2,291	1,497
Kloramfenikol-2 MIC	2,381	1,879
Eritromisin-1 MIC	2,090	1,320
Eritromisin-2 MIC	2,210	1,467

b) Pengukuran AAS

Konsentrasi Lar. Uji	Konsentrasi (ppm)	
	Ca²⁺	K⁺
Kontrol	0,50	75,85
Episitoskirin-1 MIC	1,38	85,54
Episitoskirin-2 MIC	3,53	334,53
Kloramfenikol-1 MIC	1,40	76,19
Kloramfenikol-2 MIC	3,02	94,20
Eritromisin-1 MIC	0,73	70,99
Eritromisin-2 MIC	0,94	98,80

Lampiran 7. Laporan Hasil Pengukuran AAS : a) Ion Ca^{2+} , b) Ion K^+

a) Ion Ca^{2+}



KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

F.05

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PASCAPANEN PERTANIAN
LABORATORIUM PENGUJIAN
Jalan Tentara Pelajar 12
Bogor 16114

Telp. 0251 - 8321762, 7162922
Fax. 0251- 8350920, 4741987

LAPORAN PENGUJIAN LABORATORIUM

No. Administrasi /Number	:	10a/LBBPSC/V/11
Nama/Instansi Pengirim/Name	:	Zurahmi Ulya
No. Surat Permohonan/Number of letter	:	-
Alamat Pengirim/Address	:	LIPI Puslit Biologi
Tanggal Pengiriman/Date of delivery	:	03 Mei 2011
Jenis Produk/Type of product	:	Bakteri dan jamur
Unit Kemasan/Packaging unit	:	Botol Vial

NO.	Nama Sampel Sample name	Jenis Analisis Type of Analysis	Metode Method	Hasil Result	Satuan Unit
1	1	Ca	AAS	0,50	ppm
2	2			1,24	
3	3			1,50	
4	4			1,38	
5	5			3,53	
6	6			1,40	
7	7			3,02	
8	8			0,73	
9	9			0,94	
10	10			0,93	
11	11			1,16	
12	12			1,45	
13	13			0,98	
14	14			1,57	
15	15			1,01	
16	16			1,17	
17	17			1,22	
18	18			1,44	

Bogor, 23 Mei 2011
Manajer Teknis

Drs. Dondy A Setyabudi, MS.

Laporan ini dilarang diperbanyak tanpa persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian BBPP Pascapanen Pertanian
Laporan ini hanya berlaku pada contoh yang diuji
Laporan ini merupakan hasil pengujian bukan penelitian
Sisa contoh akan kami simpan selama tiga bulan dari tanggal terbit laporan

b) Ion K^+



KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

F.05

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PASCAPANEN PERTANIAN

LABORATORIUM PENGUJIAN

Jalan Tentara Pelajar 12

Bogor 16114

Telp. 0251 - 8321762, 7162922

Fax. 0251- 8350920, 4741987

LAPORAN PENGUJIAN LABORATORIUM

No. Administrasi /Number	:	10b/LBBPSC/N/11
Nama/Instansi Pengirim/Name	:	Zurahmi Ulya
No. Surat Permohonan/Number of letter	:	-
Alamat Pengirim/Address	:	LIPI Puslit Biologi
Tanggal Pengiriman/Date of delivery	:	03 Mei 2011
Jenis Produk/Type of product	:	Bakteri dan jamur
Unit Kemasan/Packaging unit	:	Botol Vial

NO.	Nama Sampel Sample name	Jenis Analisis Type of Analysis	Metode Method	Hasil Result	Satuan Unit
1	1	K	AAS	7,58	mg/100g
2	2			8,21	
3	3			10,00	
4	4			8,55	
5	5			33,45	
6	6			7,62	
7	7			9,42	
8	8			7,10	
9	9			7,83	
10	10			7,46	
11	11			7,83	
12	12			8,12	
13	13			7,66	
14	14			8,68	
15	15			8,15	
16	16			8,97	
17	17			8,41	
18	18			10,29	

Bogor, 23 Mei 2011

Manajer Teknis,

Drs. Pandy A Setyabudi, MS.

Laporan ini dilarang diperbanyak tanpa persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian BBPP Pascapanen Pertanian

Laporan ini hanya berlaku pada contoh yang diuji

Laporan ini merupakan hasil pengujian bukan penelitian

Sisa contoh akan kami simpan selama tiga bulan dari tanggal terbit laporan

Lampiran 8. Data Pengukuran AAS : a) Ion Ca²⁺, b) Ion K⁺

a) Ion Ca²⁺

No	Kode Sampel	Bobot Sampel	Konsentrasi Standar	Absorbansi Standar	Absorbansi Sampel	Konsentrasi Sampel
1	Sa-Kontrol	6,2163	1	0,9677	0,0012	0,5
2	Sa-Epi (1 MIC)	5,8167	1	0,9677	0,0031	1,38
3	Sa-Epi (2 MIC)	1,3916	1	0,9677	0,0019	3,53
4	Sa-Klor (1 MIC)	5,5202	1	0,9677	0,003	1,4
5	Sa-Klor (2 MIC)	3,5898	1	0,9677	0,0042	3,02
6	Sa-Eri (1 MIC)	7,7661	1	0,9677	0,0022	0,73
7	Sa-Eri (2 MIC)	6,3542	1	0,9677	0,0023	0,94
8	Ct-Kontrol	6,3826	1	0,9677	0,0023	0,93
9	Ct-Epi (1 MIC)	6,5682	1	0,9677	0,0025	0,98
10	Ct-Epi (2 MIC)	4,4446	1	0,9677	0,0027	1,57
11	Ct-Amfo (1 MIC)	4,8778	1	0,9677	0,0019	1,01
12	Ct-Amfo (2 MIC)	6,1791	1	0,9677	0,0028	1,17
13	Ct-Nyst (1 MIC)	6,123	1	0,9677	0,0029	1,22
14	Ct-Nyst (2 MIC)	5,364	1	0,9677	0,003	1,44

b) Ion K⁺

No	Kode Sampel	Bobot Sampel	Konsentrasi Standar	Absorbansi Standar	Absorbansi Sampel	Konsentrasi Sampel
1	Sa-Kontrol	6,2163	1	0,0506	0,1825	75,85
2	Sa-Epi (1 MIC)	5,8167	1	0,0506	0,1926	85,54
3	Sa-Epi (2 MIC)	1,3916	1	0,0506	0,1802	334,53
4	Sa-Klor (1 MIC)	5,5202	1	0,0506	0,1628	76,19
5	Sa-Klor (2 MIC)	3,5898	1	0,0506	0,1309	94,2
6	Sa-Eri (1 MIC)	7,7661	1	0,0506	0,2134	70,99
7	Sa-Eri (2 MIC)	6,3542	1	0,0506	0,243	98,8
8	Ct-Kontrol	6,8826	1	0,0506	0,1988	74,62
9	Ct-Epi (1 MIC)	5,7682	1	0,0506	0,1711	76,63
10	Ct-Epi (2 MIC)	4,4446	1	0,0506	0,1494	86,84
11	Ct-Amfo (1 MIC)	4,8778	1	0,0506	0,1539	81,51
12	Ct-Amfo (2 MIC)	4,7791	1	0,0506	0,1659	89,68
13	Ct-Nyst (1 MIC)	6,123	1	0,0506	0,1994	84,13
14	Ct-Nyst (2 MIC)	5,364	1	0,0506	0,2137	102,92

Perhitungan Konsentrasi :

$$[]_{ion} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times []_{standar} \times \frac{\text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel}}$$

Lampiran 9. Surat Keterangan LIPI



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

SURAT KETERANGAN

UNIVERSITAS ANDALAS

Saya selaku pembimbing menerangkan bahwa Mahasiswa (S1), Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Andalas:

Nama : Zurrahmi Ulya
No. BP : 07 132 049

Telah melakukan penelitian selama 4 bulan terhitung mulai bulan Februari – Mei 2011 dengan judul: **Evaluasi Aktivitas Antimikroba (+)-2,2'-Episitokirin A dan Mekanisme Kerjanya** di Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

Demikianlah surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Cibinong, 25 Mei 2011
Laboratorium Fitokimia

Dr. Andria Agusta
NIP. 196908161994031003

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA